

**Charakterisierung von kreuzreaktiven Determinanten des
M-Proteins von Streptokokken der Gruppe A und den antigenen
Determinanten der menschlichen, renalen Glomerula**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

SABINE BIRKHOLZ

Im April 1989

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Charakterisierung von kreuzreaktiven Determinanten des
M-Proteins von Streptokokken der Gruppe A und den antigenen
Determinanten der menschlichen, renalen Glomerula**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

SABINE BIRKHOLZ

Im April 1989

Referent: Prof. Dr. W. Opferkuch
Korreferent: Prof. Dr. W. Hengstenberg

Die vorliegende Arbeit wurde an der Abteilung für Medizinische
Mikrobiologie und Immunologie der Medizinischen Fakultät der Ruhr-
Universität Bochum unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch
angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für seine großzügige Unterstützung und förderndes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Meyer, Abteilung für Biochemie supramolekularer Systeme, Ruhr-Universität Bochum, danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen und Aminosäuresequenzanalyse.

Frau Priv.-Doz. Dr. G. Haensch und Herrn M. Schönermark, Institut für Immunologie und Serologie der Universität Heidelberg, danke ich für die Durchführung von Immunfluoreszenz-Tests mit humanen Podozyten- und Mesangiumzellen.

Herrn Prof. Dr. F. W. Falkenberg danke ich für die Überlassung der monoklonalen Antikörper

Für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Interesse an meiner Arbeit danke ich besonders Herrn Dr. H. Leying, Frau Dipl. Biol. G. Geis und Herrn Dipl. Biol. U. Roder.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Ruhr-Universität Bochum für die gute Zusammenarbeit.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APGN	akute Poststreptokokken-Glomerulonephritis
ARF	akutes rheumatisches Fieber
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAREC	Caribbean Epidemiology Centre
C3b	Spaltprodukt der 3. Komplementkomponente
dest.	destilliert
demin.	demineralisiert
d.h.	das heißt
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	"Enzyme linked immunosorbent assay"
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPLC	"Fast protein liquid chromatographie"
Fr.	Fraktion
HBSS	"Hanks balanced salt solution"
HPLC	"High pressure liquid chromatographie"
HS	Pferdeserum
Ig	Immunglobulin
K	Kontrolle
kD	Kilodalton
MG	Molekulargewicht
n.b.	nicht bestimmt

NSAP	"nephritis associated protein"
OD	optische Dichte
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	"Phosphate buffered saline"
POD	Peroxidase
PMSF	Phenylmethylen-sulfonylfluorid
PTC	Phenylthiocyanat
PTH	Phenylthiohydantoin
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	"Tis buffered saline"
TT	Streptokokkenstamm von Patienten ohne APGN
U	Einheit
Ü	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute
USTR	unkomplizierte Streptokokkeninfektion
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	
1. Einführung	1
2. Extrazelluläre Produkte der Gruppe A Streptokokken	2
3. Aufbau der Zellhülle der Gruppe A Streptokokken und Funktion der einzelnen Bestandteile	3
3.1. Das M-Protein: Aufbau und Funktion	5
4. Poststreptokokken-Glomerulonephritis	10
4.1. Entstehung der APGN durch Immunkomplexbildung	14
4.2. Antikörperkreuzreaktionen zwischen Nierengewebe und Streptokokken der Gruppe A	16
5. Fragestellung	19
II. Material und Methoden	
1. Material	21
1.1. Chemikalien	21
1.2. Antikörper und Proteine	21
1.3. Puffer und Lösungen	21
1.3.1. PBS (Phosphate buffered saline)	21
1.3.2. TBS (Tris buffered saline)	22
1.3.3. HBSS-Puffer (Hanks balanced salt solution)	22
1.3.4. Lösungen für die SDS-PAGE (A) LKB und B) BioRad	22
1.3.5. Lösungen für die isoelektrische Fokussierung	23
1.3.6. Lösungen für den Western-Immunoblot und Dot-Blot-Test	24
1.3.7. Lösungen für ELISA	24
1.3.8. Lösungen für die Immunfluoreszenz	25
1.4. Bakterien	26
1.5. Monoklonale Maus-Antikörper gegen Nierengewebe	26

1.6.	Gewebematerial	26
1.7.	Antiseren	27
1.8.	Medien	27
1.8.1.	Zellkulturmedium	27
1.8.2.	Einfriermedium	27
1.8.3.	Blutagarplatten	27
2.	Methoden	28
2.1.	Streptokokken-Dauerkulturen	28
2.2.	Anzucht von Streptokokken	28
2.3.	Anzucht von Hybridomzellen	28
2.4.	Gewinnung von Aszites-Flüssigkeit	28
2.5.	Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Aszites	29
2.6.	Proteinbestimmung	29
2.7.	Indirekter Immunfluoreszenz-Test	29
2.7.1.	Indirekter Immunfluoreszenz-Test mit nativem Gewebe	29
2.7.2.	Indirekter Immunfluoreszenz-Test mit isolierten, nativen Glomerula	30
2.7.3.	Indirekter Immunfluoreszenz-Test mit in Kultur gewachsenen Zellen	30
2.8.	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	31
2.8.1.	Protein-ELISA	31
2.8.2.	Ganzzell-ELISA	31
2.8.3.	Inhibition der Antikörperreaktion mit Proteinen	32
2.9.	Dot-Blot-Test	32
2.10.	Opsonophagozytose-Test	33
2.11.	Blutpassagen	33
2.12.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.13.	Western-Immunoblot	35
2.14.	Elektroelution	35

2.15.	Isoelektrische Fokussierung	35
2.16.	Mutanolysin-Extraktion und partielle Reinigung von Oberflächenproteinen von Streptokokken	36
2.17.	Enzymatische Spaltung von Streptokokken-Oberflächenproteine	36
2.17.1.	Pepsin-Extraktion von Streptokokken-Oberflächenproteinen	36
2.17.2.	Pepsin-Spaltung Mutanolysin-extrahierter Streptokokken-Oberflächenproteine	37
2.17.3.	Trypsin-Spaltung Mutanolysin-extrahierter Streptokokken-Oberflächenproteine	37
2.18.	Immunisierung von Kaninchen	38
2.18.1.	Immunisierung von Kaninchen mit Streptokokkenzellen	38
2.18.2.	Immunisierung von Kaninchen mit Mutanolysin-extrahierten Streptokokken-Oberflächenproteinen	38
2.18.3.	Absorption der gewonnenen Kaninchenserum mit einem M-Protein armen Streptokokken-Stamm	39
2.19.	Isolierung renaler Glomerula	39
2.20.	Isolierung glomerulärer Antigene	39
2.20.1.	SDS-Extraktion glomerulärer Antigene	39
2.20.2.	Mechanischer Aufschluß von Glomerula	40
2.20.3.	Gelchromatographische Auftrennung löslicher renaler Proteine	40
2.21.	Aminosäuresequenzanalyse	41
2.22.	PTC-Aminosäureanalyse	41
III.	Ergebnisse	
1.	Auswahl monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes Nierengewebe im Hinblick auf Kreuzreaktionen mit Oberflächen-Antigenen von Streptokokken der Gruppe A	43
1.1.	Reaktion der kreuzreaktiven monoklonalen Antikörper mit menschlichem Nierengewebe	43
1.2.	Reaktionen der monoklonalen Antikörper mit nativen Streptokokken	45

2.	Untersuchungen zu den kreuzreaktiven Determinanten von Streptokokken der Gruppe A	48
2.1.	Opsonophagozytose-Test	48
2.2.	Isolierung nativer Streptokokken-Oberflächenproteine	49
2.3.	Darstellung der Streptokokken-Oberflächenproteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Immunoblot	53
3.	Nachweis der Immunogenität der Mutanolysin-extrahierten Streptokokken-Oberflächenproteine	56
4.	Lokalisation der antigenen Determinanten	59
4.1.	Pepsin-Spaltung von Streptokokken-Oberflächenproteinen	59
4.1.1.	ELISA mit Pepsin-behandelten Streptokokken und deren Überstände nach Pepsinbehandlung	59
4.1.2.	Darstellung der Pepsin-extrahierten Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	63
4.2.	Limitierte Pepsinspaltung von Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen	64
5.	Reinigung und Identifizierung des Pepsin-extrahierten 23 kD Peptids der M-Typ 1 Stämme	65
5.1.	Reinigung des 23 kD Peptids	66
5.2.	Identifizierung des 23 kD Peptids des Stammes M1 R86/436	68
6.	Darstellung des glomerulären Antigens	70
6.1.	Isolierung der Glomerula	70
6.2.	SDS-Extraktion von Proteinen aus isolierten Glomerula	71
6.3.	Charakterisierung der glomerulären Antigene	74
6.3.1.	Aufschluß isolierter Glomerula	74
6.3.2.	Gelchromatographische Auftrennung der löslichen Proteine nach Glomerulaaufschluß	77
6.4.	Aminosäureanalyse glomerulärer, immunreaktiver Proteine	80
7.	Darstellung der Antigene glomerulärer Zellen aus Zellkulturen	82
8.	Reaktion der monoklonalen Antikörper mit den intermediären Filamenten Vimentin und Desmin	82

9.	Untersuchungen an Streptokokkenstämme von Patienten mit APGN oder "einfacher" Streptokokkeninfektion und den jeweils zugehörigen Patientenseren	85
9.1.	Reaktion der Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteine ausgesuchter Patientenstämme mit den entsprechenden Patientenseren	86
9.2.	Reaktion von Patientenseren mit SDS-extrahierten Proteinen aus isolierten Glomerula	89
9.3.	Reaktion der Patientenseren mit den intermediären Filamenten Vimentin und Desmin	92
IV.	Diskussion	
1.	Spezifität der monoklonalen Antikörper	94
1.1.	Fc-Rezeptoren der Streptokokken	94
1.2.	Gewebsspezifität der monoklonalen Antikörper	95
2.	Identifizierung kreuzreaktiver Determinanten auf dem M-Protein der Gruppe A Streptokokken	96
2.1.	Identifizierung der kreuzreaktiven Determinanten auf dem M-Protein	96
2.2.	Lokalisation der antigenen Determinanten auf dem M-Protein	100
2.3.	Unterschiede im Opsonisierungsverhalten der monoklonalen Antikörper gegenüber Streptokokkenstämmen des gleichen M-Typs	102
3.	Identifizierung des glomerulären Antigens	105
4.	Hinweise auf mögliche kreuzreaktive Antikörper in Seren von APGN-Patienten	112
5.	Schlußbetrachtungen	114
V.	Zusammenfassung	117
VI.	Literaturverzeichnis	121

I. Einleitung

1. Einführung

Die humanpathogenen, β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe A, *Streptococcus pyogenes*, sind weitverbreitete Krankheitserreger, deren natürliches Reservoir der Mensch ist. Sie verursachen eine Anzahl verschiedener Erkrankungen, besonders des Nasen-Rachenraumes (Pharyngitiden, Tonsillitiden) als auch der Haut (Pyodermien) (Wannemaker, 1970). Aus diesen eitrigen Erkrankungen können sich schwere, sogenannte nicht-eitrige Folgeerkrankungen entwickeln, deren Erscheinungsbild sich vor allem als akutes rheumatisches Fieber (ARF) oder als akute Poststreptokokken-Glomerulonephritis (APGN) manifestiert (Stollerman, 1971).

Die Aktualität dieser Folgeerkrankungen zeigt sich in einem Anstieg der Erkrankungsrate bei ARF in den U.S.A. in den letzten Jahren (Laussucq et al., 1986; Veasy et al., 1986), sowie in dem Persistieren von Epidemiegebieten sowohl von ARF als auch APGN in Ländern wie Trinidad (Potter et al., 1978), Kuwait (Majeed et al., 1988) und Neuseeland (Lennon et al., 1988). Diese Entwicklung forcierte die Suche nach einem geeigneten Impfstoff gegen Gruppe A Streptokokken-Erkrankungen (Beachey, 1986; Bessen und Fischetti, 1988a; Bessen und Fischetti, 1988b; Bronze, 1988; Hruby et al., 1988; Poirier et al., 1988).

Das als Vaccine eingesetzte M-Protein, ein Oberflächenprotein, ist der Hauptvirulenzfaktor der Gruppe A Streptokokken, dessen antiphagozytären Eigenschaften nur durch protektive d.h. opsonogene Antikörper aufgehoben werden können (Lancefield, 1962). Behindert wurde die Vaccinentwicklung durch die antigenetische Vielfalt der M-Proteine und durch die Gewebs-

kreuzreaktiven Eigenschaften einiger antigenen Determinanten des M-Proteins (Cunningham et al., 1988; Dale und Beachey, 1985a; Dale und Beachey, 1986; Goroncy-Bermes, 1987; Goroncy-Bermes et al., 1987; Kraus und Beachey, 1988), die unter ungünstigen Umständen zur Entwicklung einer nichteitrigen Folgeerkrankung führen könnten, wie es Massel et al. (1969) für ARF beschrieben hat. Daher ist es unerlässlich, das M-Protein auf möglichst alle kreuzreaktiven Determinanten zu untersuchen und deren eventuelle Beteiligung an der Pathogenese von ARF bzw. APGN abzuwägen.

2. Extrazelluläre Produkte der Gruppe A Streptokokken

Streptokokken bilden eine Reihe von extrazellulär ausgeschiedenen Produkten, die zum Teil Enzymcharakter haben, z.B. Hyaluronidase, Streptokinase, Desoxyribonuklease, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Glykohydrolase und Hämolyse. Zum serologischen Nachweis einer Streptokokkeninfektion werden die Antikörpertiter im Patientenserum gegen Streptolysin O und Desoxyribonuclease B bestimmt, die bei einer vorliegenden Infektion zu meist erhöht sind. (Lütticken, 1984).

Toxische Eigenschaften haben vor allem die extrazellulär ausgeschiedenen erythrogenen Toxine und die Zytolysine Streptolysin O und S. Die erythrogenen Toxine (pyrogene Exotoxine) A, B und C sind sowohl physikalisch, chemisch als auch antigenetisch voneinander unterschieden (Cunningham et al., 1976; Houston und Ferretti, 1981; Schlievert et al., 1977). Ihre toxischen Eigenschaften bestehen in der Auslösung von Fieber und, oder letalen Schocks, Zytotoxizität, retikuloendotheliale Suppression und Immunsuppression. Desweiteren kann sich eine Überempfindlichkeitsreaktion der Haut einstellen, die sich als Scharlachexanthem äußert (Kim und

Watson, 1972). Die Gene für die erythrogenen Toxine liegen nach neueren Untersuchungen auf Bacteriophagen-Genome (Johnson et al., 1980; Weeks und Ferretti, 1984; Weeks und Ferretti, 1986) und können durch die Bakteriophagen auch in nicht toxische Stämme übertragen werden.

Das Zytolysin Streptolysin S wird nur in der Gegenwart von Serum produziert und ist Sauerstoff-stabil. Es liegt mit sogenannten "carrier"-Molekülen, wie Serumalbumin oder Ribonukleinsäure, assoziiert vor, die die Freisetzung des aktiven, zellgebundenen Hämolytins induzieren und dem instabilen Polypeptid als Stabilisator dienen (Ginsburg, 1970). Streptolysin S ist gegenüber verschiedenen Zellmembranen wirksam, T-Lymphozyten scheinen jedoch besonders sensitiv zu sein (Hryniewicz und Pryjma, 1977). Diese bevorzugte Wirkung und die geringe Größe (MG 2800) (Bernheimer, 1967; Koyama, 1963) scheinen verantwortlich zu sein, daß das Streptolysin S nicht immunogen ist.

Streptolysin O (SLO) ist ein thiol-aktiviertes, Sauerstoff-labiles Zytolysin, dessen Bindungsstelle an den Zellmembranen verschiedener Säugerzellen Cholesterin ist (Duncan und Buckingham, 1980; Duncan und Schlegel, 1975). Die Bindung an Cholesterin führt zu elektronenmikroskopisch sichtbaren C-, S- und kreisförmigen Strukturen, die funktionell große Poren darstellen, die den Durchtritt auch größerer Zytoplasmaproteine erlauben (Bhakdi et al., 1984; Duncan, 1974; Smyth und Duncan, 1978).

3. Aufbau der Zellhülle der Gruppe A Streptokokken und Funktion der einzelnen Bestandteile

Streptokokken der Gruppe A sind gram + Kettenkokken, deren Zellhüllenaufbau in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist.

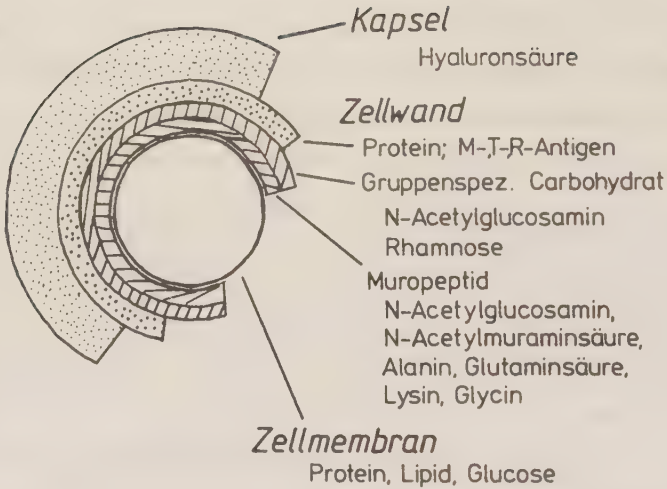


Abb.1.: Schematische Darstellung der Zelloberfläche von Streptokokken der Gruppe A (verändert nach Krause, 1972).

Die aus Hyaluronsäure bestehende Kapsel ist nicht immunogen, wahrscheinlich weil sie im chemischen Aufbau dem Bindegewebe von Säugetieren entspricht (Krause, 1972). Die antiphagozytären Eigenschaften, die normalerweise Bakterienkapseln zugesprochen werden, treffen für die Kapsel der Gruppe A Streptokokken nur auf Maus- bzw. Kaninchenblut zu (Hirsch und Church, 1960; Kass und Seastone, 1944; Whitnack et al., 1981), während Humanblut einen thermolabilen Serumfaktor besitzt, der Streptokokken entkapselt (Hirsch und Church, 1960).

Von den Oberflächenproteinen der Gruppe A Streptokokken wird das M-Protein wie auch das T-Antigen zur serologischen Typisierung der Streptokokken verwendet, wobei es pro Stamm nur einen M-Typ aber durchaus mehrere T-Typen geben kann (Bisno et al., 1971; Lancefield, 1940; Watson und

Lancefield, 1944). Die Möglichkeit der typenspezifischen Einteilung der Streptokokkenstämme wird vor allem in epidemiologischen Untersuchungen genutzt (Gaworzewska und Colman, 1988; Majeed et al., 1986). Das T-Antigen ist im Unterschied zu dem antiphagozytär wirkenden M-Protein kein Virulenzfaktor und ruft keine protektiven Antikörper hervor (Lancefield und Dole, 1946). Das gleiche gilt für das wenig charakterisierte R-Antigen (Johnson und Beachey, 1979; Lancefield und Perlmann, 1952). Aufbau und Funktion des M-Proteins wird in Abschnitt 3.1. näher besprochen.

Ein weiteres Oberflächenprotein, eine Endopeptidase, inaktiviert den humanen chemotaktischen Faktor C5a (O'Connor und Cleary, 1987; Wexler et al., 1985; Wexler und Cleary, 1985), so daß die Akkumulation von phagozytierenden Zellen am Ort der Infektion behindert wird.

Das gruppenspezifische Carbohydrat der Streptokokken der Gruppe A, auch C-Substanz genannt, besteht aus N-Acetylglucosamin und Rhamnose und wird zur gruppenspezifischen Einteilung der Streptokokken nach Lancefield verwendet (Coligan et al., 1978; Lancefield, 1933). Der Komplex aus C-Polysaccharid und Peptidoglykan übt eine gewisse Gewebstoxizität aus (Schwab et al., 1959).

3.1. Das M-Protein: Aufbau und Funktion

Das an der Zelloberfläche exponierte M-Protein gibt den Streptokokken der Gruppe A die Möglichkeit, sich der Phagozytose durch menschliche Neutrophile zu entziehen. Daher wird das M-Protein als einer der Hauptvirulenzfaktoren angesehen (Lancefield, 1962).

Es gibt über 80 verschiedene Serotypen des M-Proteins. Der Aufbau des M-Proteins ist für den Serotyp 6 am besten untersucht (Fischetti et al., 1988). Die Ergebnisse dieser Strukturaufklärung können aber im Prinzip auf andere Serotypen übertragen werden.

Strukturelle und physicochemikalische Untersuchungen an verschiedenen M-Typen zeigten, daß das M-Protein der Gruppe A Streptokokken eine aus zwei α -helikalen Proteinketten bestehendes, "coiled-coil" Molekül ist und eine flexible fibrilläre Struktur ausbildet, deren aminoterminaler Region frei in die Umgebung ragt (Abb. 2) (Fischetti et al., 1987; Manjula et al., 1984; Phillips et al., 1981). Die coiled-coil Form des Moleküls wird durch eine "Sieben-Aminosäurereste-Periodizität" von hydrophoben Aminosäuren in der Aminosäuresequenz bewirkt (Khandke et al., 1987; Manjula und Fischetti, 1980b;), die auch bei anderen, eine coiled-coil Form ausbildenden Molekülen, wie Fibrinogen, Myosin oder Keratin vorhanden ist (Manjula et al., 1985; Manjula und Fischetti, 1980a).

Mit Hilfe der vollständigen DNA-Sequenz des M6-Proteins konnte die Zellverankerung des Proteins geklärt werden. Hydrophobe Aminosäuren am C-terminalen Ende des M-Proteins dienen als Membrananker (Hollingshead et al., 1986). Daran schließt sich eine Prolin- und Glycin-reiche Region an, die wahrscheinlich eine β -Faltblattstruktur aufweist und in dem quervernetzten Peptidoglykan eingebettet ist (Fischetti et al., 1985; Fischetti et al., 1988; Pancholi und Fischetti, 1988).

Der zumeist α -helikale C-terminale Bereich des M-Proteins besitzt konservative Sequenzen, die auf verschiedenen M-Protein Serotypen vorkommen können (Hollingshead et al., 1987a; Jones et al., 1986; Scott et al., 1986), während der N-terminale Bereich wesentlich variabler und als Ur-

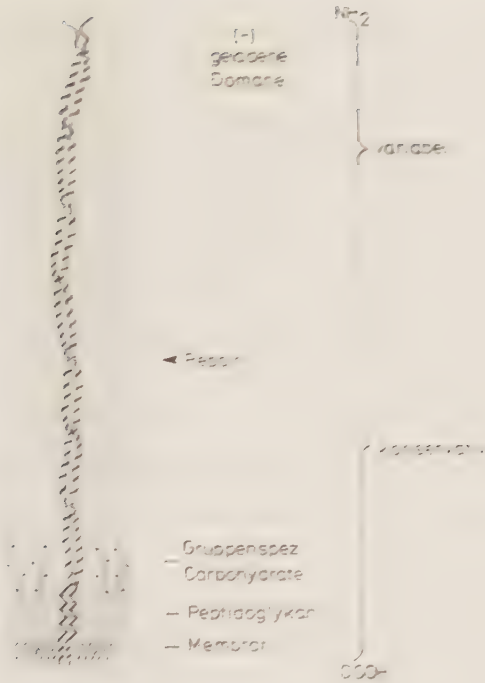


Abb. 2.: Modell eines kompletten M-Typ 6 Proteins (Fischetti et al., 1988).

Die alpha-helikale coiled-coil Region des M-Proteins hat eine Länge von 50 nm. Am äußerster N-terminalen Ende, das frei in die Umgebung ragt, befindet sich eine kurze nicht-helikale Domäne. Ebenso befindet sich in der aminoterminalen Region eine negativ geladene Domäne. Variable und konservative Regionen wurden auf der Basis von DNA Hybridisierungsversuchen und Reaktivität monoklonaler Antikörper definiert. Das Molekül wird auf der Zelle durch eine Membranverankerung am C-Terminus und durch eine angrenzende Prolin-Glycin-reiche Zellwandstabilisations-Domäne, die im Peptidoglykan eingesetzt ist, gehalten. Das Carbohydrat repräsentiert die Gruppe A spezifische Substanz. Der Pfeil markiert die Stelle des M-Proteins, die bevorzugt von Pepsin bei einem pH-Wert von 5,8 und unter limitierten zeitlichen Bedingungen gespalten wird.

sache für die zahlreichen Serotypen anzusehen ist (Jones et al., 1985; Manjula et al., 1986).

Ein Problem bei Untersuchungen an M-Protein stellt die variable Expression des M-Proteins dar. Gruppe A Streptokokken können die Fähigkeit zur M-Protein-Produktion sowohl in vivo (Rothbard und Watson, 1948) als auch in vitro nach mehreren Passagen auf künstlichen Nährmedien verlieren (Becker, 1964). Daher wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen (Beachey et al., 1978; Bisno, 1979; Manjula und Fischetti, 1980b) vor Versuchen mit M-Proteinen die Produktion durch Blut- oder Mauspassagen stimuliert (Becker, 1964; Becker, 1967). Durch molekulargenetische Untersuchungen konnte nun ein Regulatorgen identifiziert werden, das die Expression des M-Proteins reguliert (Caparon und Scott, 1987; Robbins et al., 1987).

M-Protein negative Streptokokken der Gruppe A werden mit Hilfe des alternativen Komplement-Aktivierungsweg auch in Abwesenheit von opsonogenen Antikörpern durch menschliche polymorphkernige Leukozyten phagozytiert (Peterson et al., 1979). M-Protein tragende Streptokokken sind jedoch vor der Phagozytose geschützt und können nur mit Hilfe opsonogener Antikörper gegen Determinanten des M-Proteins phagozytiert werden. Die Rolle des M-Proteins in der Phagozytose-Resistenz wurde vor allem durch die Arbeiten von Poirier et al. (1989) und von Scott et al. (1986a) aufgeklärt. Sie überführten M-Protein exprimierende Gene in a) M-Protein negative Gruppe A Streptokokken bzw. in b) Streptococcus sanguis. Durch diese Übertragung des M-Protein-Gens wurden diese Phagozytose-sensiblen Bakterien Phagozytose-resistent. Der eigentliche Mechanismus der Phagozytose-Resistenz durch das M-Protein ist jedoch noch unklar.

Es werden verschiedene Möglichkeiten der Phagozytose-Resistenz diskutiert. Die heute gängigste Theorie beruht auf der Beobachtung, daß bei verschiedenen M-Protein Serotypen vorwiegend negativ geladene aminoterminal Domänen des M-Proteins gefunden werden (Fischetti et al., 1988; Khandke et al., 1988; Manjula et al., 1985). Die negative Ladung dieser aminoterminalen Domäne könnte eine elektrostatische Abstoßung der ebenfalls negativ geladenen Membran der Phagozyten bewirken und damit einen Zell-Zell-Kontakt verhindern (Lichtman und Weed, 1970).

Untersuchungen zur Bindung von C3b an Streptokokken der Gruppe A haben ergeben, daß sowohl M-Protein negative als auch M-Protein positive Streptokokken C3b binden (Jacks-Weis et al., 1982; Peterson et al., 1979). Allerdings ist die Menge bei M-Protein positiven Stämmen an gebundenen C3 zwei bis viermal geringer. Außerdem sind die C3-Moleküle nicht gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt, sondern liegen in "Haufen" vor. Dies könnte den von Griffin et al. (1975) beschriebenen Reißverschluß-Mechanismus bei der Phagozytose behindern. Andererseits konnte von Horstmann et al. (1988) bewiesen werden, daß Faktor H, ein zur C3b Inaktivierung befähigtes Protein, an M-Protein in verstärktem Maße gebunden wird. Es erscheint möglich, daß durch diese Faktor H-Bindung zusammen mit dem C3b-Inaktivator C3b gespalten wird, so daß dieses nicht mehr von dem C3b-Rezeptor der phagozytierenden Zellen erkannt wird und eine Komplement-abhängige Phagozytose nicht stattfinden kann.

Eine andere Gruppe von Forschern beschäftigte sich mit dem Einfluß von Fibrinogen auf die Phagozytose-Resistenz von Streptokokken. Fibrinogen und Fibrinogen-Fragmente, wie das D-Fragment, binden an M-Protein (Havlicek et al., 1987; Runehegen et al., 1981; Schmidt et al., 1987; Whitnack und Beachey, 1985a). Dabei scheint das Fibrinogen die Komple-

ment-vermittelte Phagozytose ohne Beteiligung opsonogener Antikörper durch eine "Maskierung" der Komplementbindungsstellen bzw. der gebundenen C3-Moleküle zu inhibieren. C3b-Rezeptoren der Leukozyten können diese deshalb nicht mehr erreichen (Whitnack und Beachey, 1982; Whitnack und Beachey, 1985b). Die Antikörper-vermittelte Phagozytose wird von Fibrinogen jedoch nicht beeinflusst, sofern opsonogene Antikörper in ausreichend hoher Konzentration vorhanden sind (Whitnack et al., 1984).

4. Poststreptokokken-Glomerulonephritis

Eine wichtige nicht eitrige Folgeerkrankung von Gruppe A Streptokokken-Infektionen ist die akute Poststreptokokken-Glomerulonephritis. Zum besseren Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung soll der Aufbau der menschlichen Niere kurz beschrieben werden.

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Dieses besteht aus dem von der Bowman'schen Kapsel umgebenden Glomerulum, dem proximalen und distalen Tubulus sowie der Henle'schen Schleife.

Der Filtrationsapparat wird von dem Glomerulum gebildet, das aus Epithel -, Mesangium - und Endothelzellen sowie der Basalmembran besteht (Abb. 3). Funktionell an der Filtration beteiligt ist das durch starre Poren unterbrochene Endothel, die Basalmembran, die durch den hohen Anteil an negativ geladenen Glykoproteinen auch zu einer Auswahl der filterbaren Moleküle nicht nur nach Größe sondern auch nach Ladung beiträgt, und die Epithelzellen, auch Podozyten genannt, die durch ihre um die Kapillaren geschlungenen Fußfortsätze ein Sieb mit flexiblen Porendurchmessern bilden (Abb. 4) (Langer, 1985).

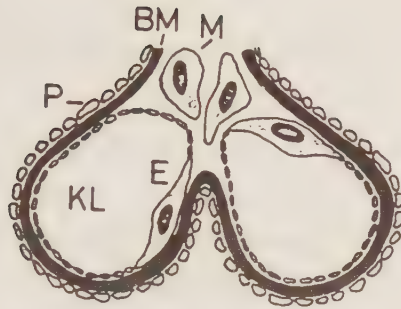


Abb.3.: Darstellung zweier Kapillaren des menschlichen Glomerulums. (Aus Sorger, 1982).

KL = Kapillarlumen; E = Endothel; M = Mesangiumzelle; BM = Basalmembran; P = Podozyten (viscerales Deckepithel)

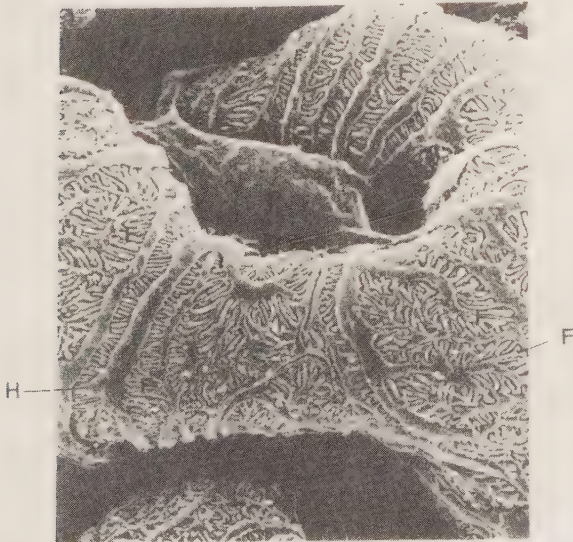


Abb.4.: Rasterelektronenmikroskopaufnahme einer Kapillarschlinge des Glomerulums (Andrews, 1988).

P = Podozytenzellkörper, H = Hauptfortsatz der Podozytenzelle, F = Fußfortsätze der Podozytenzelle

Der Zusammenhang von Infektionen mit Streptokokken der Gruppe A und die Ausbildung einer APGN konnte zweifelsfrei bewiesen werden (Longcope et al., 1928,).

Rammelkamp und Weaver (1953) fanden, daß nur bestimmte Streptokokkenstämme APGN hervorrufen können und bezeichneten diese als "nephritogen" im Gegensatz zu den rheumatogenen Stämmen, die ARF hervorrufen (Bisno, 1980; Stollerman, 1971). Die Entwicklung von ARF konnte nur nach Infektion des Rachens mit rheumatogenen Streptokokken beobachtet werden, während APGN sowohl nach Rachen- als auch nach Hautinfektionen auftreten kann (Dillon, 1967; Parker, 1969; Rammelkamp; 1980; Wannamaker, 1970).

Zu den nephritogenen M-Typen, die potentiell in der Lage sind, APGN zu erzeugen, gehören M 2, 3, 4, 12, 25, 49, 55, 57, 60, 31, 51, 52, 56, 59, 61, sowie die M-Typen 1 und 6, die in der Lage sind, sowohl ARF als auch APGN zu erzeugen (Majeed et al., 1986; Majeed et al., 1988; Martin, 1988; Potter et al., 1978; Williams, 1987).

Symptome einer APGN zeigen sich innerhalb von 1-3 Wochen nach einer Streptokokken-Infektion in Form von Ödemen, Hypertension, Proteinurie, Hämaturie (Rammelkamp, 1980; Vogl et al., 1986; Williams, 1987). Bei den meisten Erkrankten sinkt die Konzentration der 3. Komplement-Komponente (C3) und damit die hämolytische Gesamt-Komplementaktivität rapide ab (Derrick et al., 1970; Nissenson et al., 1979; Rodriguez-Iturbe et al., 1976; Williams et al., 1972).

Das morphologische Bild der APGN zeigt eine Proliferation von Mesangium- und Endothelzellen im endokapillaren Raum der Glomerula mit einer großen Anzahl polymorphkerniger Granulozyten pro Glomerulum (Andres et al., 1965). Auffallend sind besonders Immundepots, die subepithelial, subendo-

thelial oder mesangial lokalisiert sein können (Herdson et al., 1966; Sorger, 1985) (Abb. 5). In diesen Immundepots sind vor allem IgG und C3 nachweisbar (Feldmann et al., 1966; Rodriguez-Iturbe et al., 1979; Sorger et al., 1982; Yoshizawa et al., 1973).

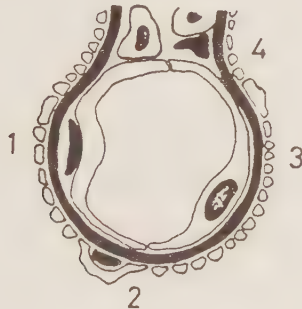


Abb.5.: Schematische Darstellung einer Glomerulusschlinge mit den bei der akuten Poststreptokokken-Glomerulonephritis gefundenen vier Orten der Depotablagerung (Sorger, 1985).

1 = subendothelial, 2 = subepithelial, 3 = intramembranös,
4 = mesangial

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die APGN eine immunologisch vermittelte Erkrankung ist, doch die Frage nach der Entstehung einer APGN konnte bis heute nicht befriedigend geklärt werden. Formuliert wurden im wesentlichen folgende Hypothesen:

- Entstehung der APGN durch Immunkomplexbildung

- a) in situ durch Ablagerungen von Streptokokken-Antigenen in der Niere und anschließender Reaktion mit Immunglobulinen
- b) im Blutkreislauf und deren Ablagerung in den Glomerula

- Antikörper-unabhängige Schädigung der Glomerula durch Ablagerung eines Nephritis assoziierten Proteins
- Antikörperkreuzreaktionen zwischen Nierengewebe und β -hämolsysierenden Streptokokken der Gruppe A.

4.1. Entstehung der APGN durch Immunkomplexbildung

Außer Immunglobuline und C3 konnten in Glomerula von Patienten mit APGN in einigen Fällen Streptokokken-Antigene nachgewiesen werden (Andres et al., 1965; Lange et al., 1976; Michael et al., 1966; Seegal et al., 1965), während andere Studien solche Antigene nicht nachweisen konnten (Feldmann et al., 1966).

In einigen Nierenbiopsien von APGN Patienten konnten extrazelluläre, kationische Streptokokkenantigene (Vogt et al., 1983), Zellwandantigene (Michael et al., 1966), M-Protein (Seegal et al., 1965), Streptokokken-plasmamembran-Antigene (Treser et al., 1969, 1970), ein intrazelluläres Protein, Endostreptosin (Lange et al., 1983; Seligson et al., 1985; Yoshizawa et al., 1973), oder ein extrazelluläres Streptokokkenprotein, NSAP (nephritis strain associated protein) (Villarreal et al., 1979), nachgewiesen werden. Ebenso konnten in den Patientenserum für die entsprechenden Antigene Antikörper gefunden werden, so daß auf eine in situ-Komplexbildung geschlossen werden kann, besonders da in einigen Untersuchungen ein zeitabhängiger Nachweis "nackter" Antigene im Frühstadium der Erkrankung nachgewiesen wurde (Lange et al., 1976; Treser et al., 1969).

Eine Beteiligung der Immunkomplexbildung im Blutkreislauf an der Pathogenese der APGN wurde durch Untersuchungen von Mezzano et al. (1986),

Prakash et al. (1988) und van de Rijn et al. (1978), in Frage gestellt. Sie fanden zirkulierende Immunkomplexe sowohl bei Patienten mit APGN als auch mit ARF (Prakash et al., 1988; van de Rijn et al., 1978). Mezzano et al. (1986) konnte auch in Seren von Impetigo-Patienten in 46% der Fälle zirkulierende Immunkomplexe nachweisen.

Die bei einer Anzahl von Patienten mit APGN gefundenen IgM-, und IgG-Rheumafaktoren (McIntosh et al., 1978; Sesso et al., 1986; Rodriguez-Iturbe et al., 1979) liegen wider Erwarten frei und nicht komplexiert im Serum vor (Potter et al., 1982; Sesso et al., 1986).

Ein anderer Ansatz zur Klärung der Pathogenese der APGN geht von glomerulären Schädigungen durch Streptokokkenenzyme aus, die im weiteren Verlauf Zellproliferation und Freisetzung zellulärer Entzündungsprodukte stimulieren. Diese Hypothese wurde durch die Entdeckung eines Nephritis-Stamm assoziierten Proteins (NSAP) gestützt (Villarreal et al., 1979). Dieses extrazelluläre Protein konnte bisher nur von Stämmen, die von Patienten mit APGN isoliert wurden, gewonnen werden (Ohkuni et al., 1983; Villareal et al., 1979) und besitzt ein Molekulargewicht von 46 kD. Durch Aminosäureanalyse des Proteins wurde es als eine Streptokinase identifiziert (Johnston und Zabriskie, 1986). Dies stimmt mit den biochemischen Analysen überein, die zeigen, daß das NSAP, gleich einer Streptokinase, Plasminogen-aktivierende Eigenschaften besitzt (Johnston und Zabriskie, 1986). Die biologischen Eigenschaften des NSAP könnten für zahlreiche klinische und pathologische Befunde der APGN verantwortlich sein.

4.2. Antikörperkreuzreaktionen zwischen Nierengewebe und Streptokokken der Gruppe A

Eine weitere Hypothese zur Pathogenese der APGN ist die Entwicklung von kreuzreaktiven Antikörpern, die sowohl mit Streptokokken-Antigenen als auch mit Nierenantigenen reagieren können. Solche kreuzreaktiven Antigene von Säugetiergewebe und Mikroorganismen sind oft beobachtet worden (Lyampert und Danilova, 1975).

Durch die antigenetischen Ähnlichkeiten zwischen den Mikroorganismen und dem Gewebe unterbleibt die Immunantwort gegen die mikrobielle Determinante, die nicht als fremd erkannt werden kann. Diese Mimikry wird deutlich an der Kapsel der Gruppe A Streptokokken, die keine Immunantwort hervorruft, da sie identisch ist mit der Hyaluronsäure, die im Bindegewebe von Säugern vorkommt (Krause, 1972).

Bei einer Gewebsschädigung durch kreuzreaktive Antikörper muß postuliert werden, daß die Immuntoleranz aufgehoben wird (Cooke et al., 1983). Die Darbietung der kreuzreaktiven Determinante auf einem anderen als dem Wirts-Trägermolekül trägt dazu bei, daß das Antigen als fremd erkannt werden kann. Auch die Bindung eines mikrobiellen Proteins an ein Wirtsprotein kann die immunologische Erkennungsreaktion soweit beeinflussen, daß gegen das Wirtsprotein Autoantikörper gebildet werden können (Cooke et al., 1983; Benacerraf und Unanue, 1982).

Autoantikörper in Patientenseren, die an APGN erkrankt waren, wurden von Lange et al. (1949) und Liu et al. (1958) mit Hilfe von Agglutinationstests nachgewiesen. Sie wurden jedoch nicht näher charakterisiert. Markowitz et al. (1960) berichtete über kreuzreagierende Antigene von

Streptokokken und Ratten-Glomerula. Mit Kaninchen- α -Serum gegen verschiedene Streptokokken- und Glomerulabestandteile konnte eine Kreuzreaktion zwischen löslichen Bestandteilen des menschlichen Glomerulums und Streptokokken-Zellmembranen nachgewiesen werden (Markowitz und Lange, 1964). Widersprüchliche Angaben über die Lokalisation der Antigene gab es in den nachfolgenden Untersuchungen. Kreuzreagierende Antigene wurden auf Streptokokken-Zellmembranen und glomerulärer Basalmembran von Blue et al. (1980), Fitzsimons et al. (1987), Lange (1980), und Lange et al. (1986) lokalisiert. Holm (1967) hingegen beschreibt Kreuzreaktionen zwischen Komponenten eines Streptokokken-Zellwandextrakts und der menschlichen Niere, während Goroncy-Bermes (1987) und Kraus und Beachey (1988) kreuzreagierende Determinanten auf dem M-Protein der Streptokokken und menschlichen Glomerula lokalisierten.

Die in der älteren Literatur beschriebenen Kreuzreaktionen zwischen Streptokokken und Säugergewebe erscheinen nicht mehr eindeutig interpretierbar, seitdem Fc-Rezeptoren auf Streptokokkenzellen nachgewiesen werden konnten (Kronvall, 1973; Schalén et al., 1978); denn die meisten verwendeten Methoden schließen eine Beteiligung von Fc-Rezeptoren nicht aus. Vor allem Absorptionsversuche von Antikörpern aus Human- und Kaninchen-serum und Streptokokkenbestandteilen wurden dadurch in Frage gestellt, da nachgewiesen wurde, daß humane IgG und IgA, Kaninchenantikörper, sowie Immunglobuline anderer Spezies von Streptokokken der Gruppe A gebunden werden können (Christensen et al., 1979a; Grubb et al., 1982; Schalén et al., 1978; Schalén et al., 1980; Wagner et al., 1983). Einen kritischen Überblick über die ältere Literatur zu Kreuzreaktionen und deren Stellenwert in Bezug zu Streptokokken-Fc-Rezeptorbindungen gibt Christensen et al. (1979b).

Wie schon erwähnt, kann die Immuntoleranz auch dann unterlaufen werden, wenn ein "Selbst"-Antigen in Kombination mit einem fremden Antigen vorliegt, so daß das körpereigene Antigen als "fremd" erkannt wird. Einige Ergebnisse scheinen für diese Möglichkeit der Entstehung von Autoantikörpern in der APGN zu sprechen. So wurden Antikörper in Patientenserum mit APGN gefunden, die mit Basalmembranantigenen des Glomerulums, namentlich Collagen, Laminin (Kefalides et al., 1986) und glomeruläre Heparan-Sulfat Proteoglykane (Fillit et al., 1985) reagieren. Untersuchungen von Stinson und Bergey (1982) (Bergey und Stinson, 1988) beschreiben ein durch Heparin und Heparan-Sulfat inhibierbares Protein aus einem Streptokokken-Zellextrakt, das an Basalmembranen von Affennieren bindet. Eine andere Arbeitsgruppe (Switalski et al., 1984) konnte die Bindung von Laminin an Streptokokkenzellen nachweisen. Obwohl in keiner der Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen den Nierenantigen-bindenden Streptokokkenproteinen und der Entstehung von Nieren-Autoantikörpern diskutiert wird, könnte dieser durchaus bestehen.

Der Literaturüberblick zeigt, daß es eine Vielzahl von Hypothesen zur Entstehung der APGN gibt. Obwohl einige der hier aufgeführten Mechanismen sicherlich am Entzündungsprozeß beteiligt sind, konnte bei keinem der direkte Nachweis einer Initiation der Erkrankung erbracht werden.

5. Fragestellung

Untersuchungen zu Kreuzreaktionen von Streptokokken und menschlichem Gewebe im Hinblick auf die Entwicklung einer Autoimmunreaktion wurden vor allem im Zusammenhang mit dem akuten rheumatischen Fieber durchgeführt. Es konnte eindeutig bewiesen werden, daß M-Proteine rheumatogener Streptokokken gemeinsame antigene Determinanten mit dem Herzmuskel tragen (Dale und Beachey, 1982; Dale und Beachey, 1985a). Als kreuzreaktives Antigen konnte das Myosin identifiziert werden (Chalovich und Fischetti, 1986; Cunningham et al., 1986; Cunningham und Swerlick, 1986; Dale und Beachey, 1985b, 1986; Krisher und Cunningham, 1985).

Im Vergleich dazu gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit Antikörperkreuzreaktionen mit M-Protein und menschlichem Nierengewebe beschäftigen (Goroncy-Bermes, 1987; Goroncy-Bermes et al. 1987; Kraus und Beachey, 1988).

Kraus konnte kreuzreaktive Antikörper gegen menschliche Glomerula in einem Kaninchenserum nachweisen, daß durch die Immunisierung mit einem synthetisch-hergestellten M1-Peptid entstand. Vier Aminosäuren am aminoterminalen Ende des Peptids bilden die kreuzreaktive Determinante des M-Proteins. Das glomeruläre Antigen wurde nicht weiter identifiziert.

Goroncy-Bermes (1987) beschrieb Kreuzreaktionen eines monoklonalen Mausantikörpers, der gegen humane, renale Glomerula gerichtet war, mit Streptokokken der Gruppe A im ELISA. Daten aus in vitro Opsonisierungsversuchen und Western-Immunoblots mit säureextrahierten Streptokokken-Oberflächenproteinen legten nahe, daß es sich bei dem kreuzreagierenden Antigen um M-Protein handeln könnte. Das Nierenantigen konnte mit Hilfe der Immunogold-Elektronenmikroskopie auf den Podozyten lokalisiert werden. Im

Western-Immunoblot mit Nierenextrakt reagierte ein 43 kD Protein mit dem monoklonalen Antikörper.

Zur Weiterführung der Untersuchungen von Goroncy-Bermes (1987) sollten in dieser Untersuchung die kreuzreaktiven Antigene von 1.) nephritogenen Streptokokken der Gruppe A und 2.) den menschlichen Glomerula näher charakterisiert werden. Die Frage nach weiteren kreuzreaktiven Antigenen von Streptokokken der Gruppe A und menschlichen Glomerula sollte durch den Einsatz zweier weiterer monoklonaler Mausantikörper geklärt werden.

Da die Beteiligung des M-Proteins an den Kreuzreaktionen in der vorherigen Untersuchung nur indirekt bewiesen werden konnte, erschien es angebracht, das beteiligte Protein zu isolieren und die Aminosäuresequenz zu bestimmen, um das Protein eindeutig identifizieren zu können.

Desweiteren sollte das oder die glomerulären Antigene näher charakterisiert werden. Durch Isolierung der humanen Glomerula sollte die Ausbeute an glomerulären Proteinen erhöht werden, so daß sich einige biochemischen Untersuchungen anschließen lassen.

Schließlich sollten Untersuchungen mit Humanseren von Patienten mit APGN oder mit "einfachen" Streptokokken-Infektionen an Oberflächenproteinen der zugehörigen, infektiösen Streptokokkenstämme und Proteinen eines Glomerula-Extraktes klären, ob es erste Hinweise auf mögliche kreuzreaktive Antikörper gibt, die durch Infektion mit nephritogenen Stämmen hervorgerufen wurden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren vom höchsten Reinheitsgrad (p.A.) und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

1.2. Antikörper und Proteine

Goat-Anti-Mouse Ig-POD	Medac (Hamburg)
Goat-Anti-Rabbit Ig-POD	Nordic Immunology (Niederlande)
Goat-Anti-Human Ig-POD	Medac (Hamburg)
Goat-Anti-Mouse Ig-FITC	Medac (Hamburg)
Monoclonal Mouse Anti-Vimentin	Dakopatts (Dänemark)
Rat-Anti-Mouse Ig-FITC	Medac (Hamburg)
Rinder-Vimentin	Amersham (Großbritannien)
Huhn-Desmin	Amersham (Großbritannien)

1.3. Puffer und Lösungen

1.3.1. PBS (Phosphate buffered saline)

Zur Herstellung von PBS wurde eine Stammlösung aus 180 g NaCl, 28,66 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 5,34 g KH_2PO_4 auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt und 1:20 verdünnt (pH 7,4).

1.3.2. TBS (Tris buffered saline)

50 mM Tris und 200 mM NaCl wurden mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 8,2 eingestellt.

1.3.3. HBSS-Puffer (Hanks balanced salt solution)

Zur Herstellung einer 10fach konzentrierten Stammlösung wurden 40 g NaCl, 2 g KCl, 0,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und 0,5 g KH_2PO_4 gelöst und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Der Gebrauchspuffer wurde hergestellt, indem 20 ml Stammlösung (10x) und 5,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,3, auf 200 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und 0,34 ml einer 1,1 M $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung und 0,4 ml einer 0,4 M $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung hinzugefügt wurden.

1.3.4. Lösungen für die SDS-PAGE (A) LKB und B) BioRad)

Elektrodenpuffer: A) In 5 l Aqua bidest. wurden 100g Glycin, 15 g Tris und 5 g SDS gelöst. B) Eine Stammlösung aus 15 g Tris, 72 g Glycin und 5 g SDS wurde auf 1 l mit Aqua bidest. aufgefüllt und 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt.

Probenpuffer: A) Der Probenpuffer setzte sich aus 20 ml Glycerin, 5 ml Mercaptoethanol, 2 g SDS, 25 ml einer 25 M Tris/HCl-Lösung (pH 6,8) und 10 mg Bromphenolblau zusammen und wurde auf 100 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. B) Der Puffer enthielt 4 ml Aqua bidest., 1 ml einer 0,5 M Tris/HCl-Lösung (pH 6,8), 0,8 ml Glycerin, 1,6 ml einer 10 %igen SDS-Lösung, 0,4 ml Mercaptoethanol und 0,2 ml einer 0,05 %igen Bromphenolblau-Lösung.

Stammlösung I (Trenngel): A) 44,0 g Acrylamid, 0,8 g Methylenbisacrylamid wurden mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt. B) 29,2 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid wurden mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

Stammlösung II (Sammelgel): A) 30,0 g Acrylamid, 0,8 g Methylenbisacrylamid wurden mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt. B) s. Stammlösung I

Ammoniumpersulfat-Lösung: A) 10 mg/ml Ammoniumpersulfat wurden in Aqua bidest. gelöst. B) 10 mg Ammoniumpersulfat wurden in 1 ml Aqua bidest. gelöst.

Trenngelpuffer: A) Der Puffer bestand aus 0,75 M Tris/HCl (pH 8,8). B) Der Puffer bestand aus 1,6 M Tris/HCl (pH 8,8).

Sammelgelpuffer: A) Der Puffer bestand aus 0,25 M Tris/HCl (pH 6,8). B) Der Puffer bestand aus 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8).

Proteinfärbelösung: Die Färbelösung bestand aus 0,7 g Coomassie Brilliant Blue R 250 (Pharmacia, Schweden), 115 ml Methanol, 115 ml Aqua bidest. und 23 ml Essigsäure.

Entfärbelösung: Als Entfärbelösung wurde ein Gemisch aus 360 ml Methanol, 120 ml Essigsäure und 1520 ml Aqua bidest. verwendet.

1.3.5. Lösungen für die isoelektrische Fokussierung

Elektrodenlösungen und Fertiggele stammen von LKB (Pharmacia, Schweden). Fixierlösung, Färbelösung und Entfärbelösung wurden nach einer Vorschrift der Firma LKB hergestellt.

1.3.6. Lösungen für den Western-Immunoblot und Dot-Blot-Test

Blotting-Puffer: Zur Herstellung des Blotting-Puffers wurden 64,5 g Glycin, 13,5 g Tris und 400 ml Methanol auf 3 l mit Aqua demin. aufgefüllt.

Blockierungspuffer: Zum Absättigen freier Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose wurde 0,1% Tween 20 in PBS verwendet. Zum Absättigen der Blots mit Nierenproteinen wurde 5% Milchpulver (Difco, Detroit) in PBS mit 0,05% Tween 20 eingesetzt.

Waschpuffer: Der Waschpuffer bestand aus 0,05% Tween 20 in PBS.

Substratlösung: 15 mg 4-Chloro-1-Naphthol wurden in 5 ml Methanol gelöst. 5 ml dieser Stammlösung wurden mit 25 ml TBS und 10 µl einer 30 %igen H₂O₂-Lösung gemischt.

1.3.7. Lösungen für ELISA

Beschichtungspuffer: Die Proteine wurden in einem Puffer aus 0,2 M Dinatriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat, pH 9,6, an die Mikrotiterplatte adsorbiert.

Blockierungspuffer: Freie Proteinbindungsstellen wurden mit 1% (w/v) BSA in PBS abgesättigt. Bei der Verwendung von Humanseren wurde mit 20% (v/v) Kaninchenserum in PBS abgesättigt.

Antikörperverdünnungspuffer: Der Verdünnungspuffer bestand aus 1% (w/v) BSA in PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20. Die Humansenen wurden in 20% (v/v) Kaninchenserum in PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20 abgesättigt.

Waschpuffer: Als Waschpuffer wurde 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS eingesetzt.

Substratlösung: Die Substratlösung wurde aus 10 mg o-Phenylendiamin, 10 ml 0,1 M Citrat, pH 4,5, und 4 µl einer 30 %igen H₂O₂-Lösung hergestellt.

1.3.8. Lösungen für die Immunfluoreszenz

Blockierungspuffer: Die freien Proteinbindungsstellen wurden mit 20% Ziegenserum in PBS abgesättigt.

Antikörperverdünnungspuffer: Die Antikörper wurden mit Blockierungspuffer verdünnt.

Eindeckpuffer: 14 g Glycin, 17,5 ml 1 N NaOH und 17 g NaCl wurden in Aqua dest. gelöst und auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt. In 10 ml dieser Lösung wurden 100 mg p-Phenylendiamin gelöst und der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. 1 Teil dieser Lösung wurde mit 2 Teilen Glycerin gemischt und als Eindeckpuffer benutzt.

1.4. Bakterien

Es wurden folgende Streptokokken-Stämme verwendet: M1 Ref, M4 Ref, M4 Di 667, M5 Ref, M6 Ref, M12 Ref, M18 Ref, M19 Ref, M49 V-5143 und M52 Ref wurden von Herrn Prof. Lütticken, Hygiene Institut der Universität Köln, M1 R86/436 von Herrn Dr. Colman, Public Health Laboratory Service, London, die Stämme APGN 24, APGN 25, APGN 30, APGN 31, APGN 34, APGN 38, APGN 40, APGN 44, TT 3, TT 13, TT 14, TT 15, TT 16, TT 17, TT 18 von Herrn Dr. Reid, Caribbean Epidemiology Centre, Port of Spain, Trinidad, und die Stämme M6 BL und M24 BL von Herrn Prof. Beachey, VA Hospital, Memphis, USA, zur Verfügung gestellt.

1.5. Monoklonale Maus-Antikörper gegen Nierengewebe

Die verwendeten monoklonalen Maus-Antikörper wurden von Hybridoma-Zelllinien gewonnen, die freundlicherweise Herr Prof. Falkenberg, Med. Mikrobiologie und Immunologie, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung stellte (Falkenberg et al., 1981).

1.6. Gewebematerial

Das für die Untersuchungen notwendige Nierengewebe wurde von Herrn Prof. Senge, Urologische Abteilung der Universitätsklinik in Herne, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um einen makroskopisch und mikroskopisch gesunden Anteil von Hypernephrom-Nieren.

1.7. Antiseren

Die Patientenserum stammen aus einem Gebiet mit gehäuftem Auftreten von akuter Poststreptokokken-Glomerulonephritis auf Trinidad, Tobago von Herrn Dr. Reid, CAREC. Der Human-Normalserum-Pool wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe gewonnen. Das Kaninchen-Antiserum gegen pep M6-Fragmente wurde von Herrn Prof. Beachey, VA Hospital, Memphis, USA, zur Verfügung gestellt.

1.8. Medien

1.8.1. Zellkulturmedium

Als Zellkulturmedium wurde "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM, Difco) benutzt, wobei zu 500 ml DMEM 8 ml einer 200 mM L-Glutamin-Lösung, 5 ml einer 100 mM Natrium-Pyruvat-Lösung und 6 ml einer Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 E/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)(Gibco) hinzugefügt wurden.

1.8.2. Einfriermedium

Die Hybridomzellen wurden in DMEM mit 12% (v/v) DMSO (Riedel de Häen) und 25% (v/v) Pferdeserum eingefroren.

1.8.3. Blutagarplatten

Der Blutagar bestand aus 31,2 g Columbia-Agar (Oxoid), 4 g Bacto-Agar (Difco), 800 ml Aqua dest., 32 ml defibrinisiertem Schafsblut (Oxoid).

2. Methoden

2.1. Streptokokken-Dauerkulturen

Die Streptokokkenstämme wurden über Nacht in Brain-Heart-Infusion-Medium (Oxoid), das mit 5% defibrinisiertem Schafsblut supplementiert war, bei 37 °C unter 5% CO₂-Atmosphäre angezüchtet. Aus diesen Kulturen wurden Aliquots in Einfrierröhrchen (Greiner) bei -70 °C gelagert.

2.2. Anzucht von Streptokokken

Eingefrorene Bakterien wurden aufgetaut und in Iso-Sensitest-Flüssigmedium (Oxoid) angezüchtet. Die Bakterien wurden maximal dreimal auf Blutagarplatten subkultiviert. Aus dieser Stammhaltung wurde Impfmateriäl für die Anzucht größerer Mengen an Streptokokken gewonnen.

2.3. Anzucht von Hybridomzellen

Bei -80 °C eingefrorene Hybridomzellen wurden vorsichtig bei 37 °C angetaut. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO wurde durch sofortige Zugabe von DMEM (10% HS) und Wechsel des Mediums durch Zentrifugation und Resuspension in frischem DMEM (10% HS) ausverdünnt. Am folgenden Tag wurde das Medium vollständig erneuert.

2.4. Gewinnung von Aszites-Flüssigkeit

Zur Steigerung der Antikörperausbeute wurde männlichen BALB/c-Mäusen (6-10 Wochen alt) zehn Tage nach intraperitonealer Injektion von 0,5 ml

Pristan 5×10^6 bis 1×10^7 Hybridomzellen pro Maus in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Die gebildete Aszites-Flüssigkeit wurde gewonnen.

2.5. Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Aszites

Monoklonale Antikörper der Klasse IgM wurden durch Gelchromatographie an Sephacryl S-300 (2,6 x 74 cm, Pharmacia) gereinigt (Jaton et al., 1979). Als Elutionsmittel wurde 0,01 M PBS mit 0,02% Natrium-Azid verwendet. Die IgM enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und in Dialyseschläuchen (Porengröße max. 15 kD, Serva) im Vakuum einkonzentriert. Die Aktivität der Antikörper wurde in indirekten Immunfluoreszenztests kontrolliert.

2.6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Markwell et al. (1978) durchgeführt.

2.7. Indirekter Immunfluoreszenz-Test

2.7.1. Indirekter Immunfluoreszenz-Test mit nativem Gewebe

Der indirekte Immunfluoreszenz-Test wurde nach der Methode von Coons und Kaplan (1950) durchgeführt. Mit Hilfe eines Mikro-Kryotoms (Reichert & Jung) wurden 6 μ m dicke Gewebeschnitte tiefgefrorener Organe hergestellt und auf Objektträger gebracht. Nach Antrocknen des Gewebes wurde 30 Minuten mit 20 %igem Ziegen Serum in PBS eventuell freie Proteinbindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurde das Gewebe 30 Minuten bei 37 °C in

einer feuchten Kammer mit monoklonalen Antikörpern (15 µg/ml) behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Gewebeschnitte mit FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpern überschichtet. Nach erneuter 30 minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Präparate mit PBS gewaschen und mit Eindeckpuffer überschichtet. Nach Fixierung der Deckgläschen mit Vitro-Clud wurde der Test mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Typ BH 2, Olympus) ausgewertet.

2.7.2. Indirekter Immunfluoreszenz-Test mit isolierten, nativen Glomerula

Für die Darstellung der antigenen Determinanten auf isolierten Glomerula wurde der Test leicht modifiziert. Die Antikörperreaktionen wurden nicht auf einem Objektträger durchgeführt, sondern in Eppendorf-Gefäßen (Eppendorf, Hamburg). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Glomerula auf einen Objektträger transferiert und wie oben beschrieben eingedekelt.

2.7.3. Indirekter Immunfluoreszenz-Test mit in Kultur gewachsenen Zellen.

Zellen werden auf Objektträgern herangezogen, mit warmen PBS gewaschen und 5 Minuten mit -20 °C kaltem Methanol fixiert. Zur Darstellung des Cytoskeletts werden die Zellen anschließend für 20 Minuten mit Aceton (-20 °C) behandelt und mit PBS gewaschen. Die nachfolgenden Schritte werden wie unter 2.7.1. beschrieben durchgeführt.

2.8. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

2.8.1. Protein-ELISA

Der ELISA wurde in modifizierter Form nach Clegg et al. (1980) durchgeführt. Zur Adsorption des Antigens an das Material der Mikrotiterplatte (Falcon 3912) wurden 100 µl Antigenlösung in Beschichtungspuffer pro Napf (Proteinkonzentration 5-10 µg/ml) für 2 Stunden bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte durch einstündiger Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer mit je 200 µl Blockierungspuffer. Anschließend wurden je 50 µl einer geeigneten Antikörper- bzw. Antiserum-Verdünnung für 2 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligen Waschen wurden je 50 µl eines Antikörper-Peroxidase-Konjugats (Verdünnung je nach Charge 1:1000 bis 1:1500) für 1 Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden je 200 µl Substratlösung einpipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Farb-reaktion bei einer OD_{450nm} in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Dynatech, MR600).

2.8.2. Ganzzell-ELISA

Der Ganzzell-ELISA mit Streptokokkenzellen wurde nach einer Methode von Cunningham und Russell (1983) durchgeführt. Streptokokken der unterschiedlichen Gruppen und M-Typen wurden in Iso-Sensitest-Bouillon mit 20% Kaninchenserum (Gibco) 16 bis 18 Stunden bei 37 °C angezüchtet, zweimal mit PBS gewaschen und in 2 ml PBS aufgenommen. Die Absorption dieser

Suspensionen wurde auf eine OD von 1,7-1,8 bei einer Wellenlänge von 600 nm eingestellt, um etwa identische Bakterienmengen (=Antigenmengen) zu erhalten. 50 µl dieser Suspensionen wurden in Näpfen der Mikrotiterplatte pipettiert, die sofort 5 Minuten bei 850 x g zentrifugiert wurde. Die sedimentierten Bakterien wurden mit einer Endkonzentration von 0,25% (v/v) Glutaraldehyd in PBS 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach Spülen mit PBS wurden freie Aldehydgruppen mit dem Blockierungspuffer für 2 Stunden abgesättigt. Der ELISA wurde wie in 2.8.1. angegeben mit folgenden Ausnahmen weitergeführt: Die fixierten Bakterien wurden nur 1 Stunde mit den Antikörperversdünnungen behandelt und die Substratlösung wurde nach Beendigung der Farbreaktion in eine neue Mikrotiterplatte überführt, um die Trübungsmessung der Bakterien beim Ablesen der Farbreaktion zu verhindern.

2.8.3. Inhibition der Antikörperreaktion mit Proteinen

Verschiedene Konzentrationen an monoklonalen Antikörpern wurden mit den zu testenden Proteinen (Proteinkonzentration: 200 µg/ml) für 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert und anschließend in ELISA-Tests eingesetzt.

2.9. Dot-Blot-Test

Die Bakterien wurden, wie in 2.8.2. beschrieben, angezüchtet, geerntet und auf die entsprechende OD verdünnt. Auf ein Nitrozellulose-Stück wurden punktförmig 5 µl der Bakteriensuspension aufgetragen. Nach dem Antrocknen wurde die Nitrocellulose mit Blockierungspuffer 2 Stunden bei Raumtemperatur überschichtet. Nach zweistündiger Inkubation mit einer Antikörperversdünnung von einer Endkonzentration von 15 µg/ml wurde drei-

mal für je 5 Minuten gewaschen und der mit Peroxidase gekoppelte Ziegen-anti-Maus-Antikörper dazugegeben. Nach 1 Stunde wurde dreimal mit TBS gewaschen und Substratlösung zugegeben, die nach 10 Minuten durch Wasser ersetzt wurde. Nach mehrmaligen Waschen mit Wasser wurde die Nitrozellulose getrocknet und ausgewertet.

2.10. Opsonophagozytose-Test

Der Opsonophagozytose-Test zur Überprüfung der Opsonisierung von Streptokokken der Gruppe A durch monoklonale Antikörper oder Antiseren wurde nach der Methode von Beachey et al. (1977) durchgeführt. Die Proben bestanden aus 0,35 ml frischem Blut gesunder Spender, 10 U Liquemin (Hoffmann-LaRoche, Grenzach) pro ml Blut, 50 µl einer standardisierten Streptokokkensuspension ($OD_{530nm} = 0,25$ mit einem Perkin-Elmer-Photometer; das Verhältnis Bakterien : polymorphkernigen Granulozyten war annähernd 15 : 1) und 100 µl einer geeigneten Antikörperlösung bzw. Antiserum. Die Streptokokken und die Antikörper bzw. Antiseren wurden 15 Minuten bei 37 °C und 15 Minuten bei 4 °C vor Zugabe des Humanbluts vorinkubiert. Der Prozentsatz der neutrophilen Granulozyten, die mit Streptokokken assoziiert waren, wurde mit Hilfe eines Mikroskops ermittelt. Zu diesem Zweck wurden Ausstriche auf Objektträgern von den Proben nach 30 bis 45 Minuten Rotation bei 37 °C angelegt. Eine positive Opsonisierung wurde verzeichnet, wenn die Antikörper eine Phagozytose induzierten, die mindestens 20% höher als die Negativkontrolle war.

2.11. Blutpassagen

Zur Steigerung der Phagozytose-Resistenz bzw. der M-Protein-Expression

wurden Streptokokken nach Bedarf einer Blutpassage unterzogen. Die Blutpassage wurde im Prinzip nach Becker (1967) ausgeführt. Eine wie für den Opsonophagozytose-Test angesetzte Bakteriensuspension wurde 10^{-5} -fach mit Iso-Sensitest-Bouillon verdünnt. 50 µl dieser Verdünnung wurde zu 450 µl normalem Human-Vollblut gegeben und 3 Stunden bei 37 °C über Kopf rotiert. Danach wurden 100 µl dieses Ansatzes in 700 µl frischem Human-Vollblut gegeben und nochmals 2,5 Stunden über Kopf bei 37 °C rotiert. 100 µl dieser Suspension wurde anschließend auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet. Die überlebenden Streptokokken wurden für die weiteren Versuche verwendet.

2.12. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE-Analyse erfolgte nach Lugtenberg et al. (1975) und Lämmli (1970) in 11,7% bzw. 12,8% (BioRad) Polyacrylamid-Gelen. Die zu analysierenden Proben wurden lyophilisiert, in Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten gekocht. Je nach Taschengröße wurden 20 µg (BioRad), 40 oder 80 µg Protein pro Geltasche aufgetragen. Die präparativen Gele wurden mit 1,5 mg Gesamtprotein beladen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel (BioRad: konstant mit 120 Volt). Die Bestimmung des Molekulargewichts wurde nach Weber und Osborn (1969) durchgeführt. Als Molekulargewichtstandards dienten folgende Proteine (Pharmacia, LMW-Kit): Phosphorylase b (94 kD), BSA (67 kD), Ovalbumin (43 kD), Carbonsäureanhydrase (30,0 kD), Soybean Trypsin Inhibitor (20,1 kD) und α -Lactalbumin (14,4 kD). Die Anfärbung der Proteine erfolgte 30 Minuten mit der unter 1.3.4. beschriebenen Färbelösung.

2.13. Western-Immunoblot

Der Western-Immunoblot wurde nach Towbin et al. (1979) durchgeführt. Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Transferbedingungen: 2,5 bis 3 Stunden bei 295 mA). Die Western Immunoblots wurden nach der Beschreibung unter 2.9. entwickelt.

2.14 Elektroelution

Nach einer präparativen SDS-PAGE wurden die interessierenden Gelbanden ausgeschnitten. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Biotrap (BioRad) in 0,1 M Ammoniumbicarbonat mit 0,025% SDS für 18 Stunden bei konstanten 80 V elektroeluiert und gleichzeitig durch mehrmaligen Wechsel des Elutionspuffers dialysiert.

2.15. Isoelektrische Fokussierung

LKB Ampholine PAG-Platten, pH 3,5-9,5, wurden mit 20 µg Protein beladen. Als Elektrodenpuffer wurden 1 M H_3PO_4 und 1 M NaOH verwendet. Die Fokussierung erfolgte bei 1500 V, 40 mA und 30 W für 1,5 Stunden. Danach wurden die Gele gefärbt bzw. geblottet. Zur Ermittlung der isoelektrischen Punkte wurden folgende Eichsubstanzen eingesetzt: Amyloglucosidase (pH 3,5), Soybean Trypsin Inhibitor (pH 4,55), β -Lactoglobulin A (pH 5,2), Rinder-Carbonsäureanhydrase B (pH 5,85), Human-Carbonsäureanhydrase B (pH 6,55), Pferde-Myoglobin (pH 6,85), Pferde-Myoglobin (pH 7,35), Lentil Lectin (pH 8,15), Lentil Lectin (pH 8,45), Lentil Lectin (pH 8,65) und Typsinogen (pH 9,3).

2.16. Mutanolysin-Extraktion und partielle Reinigung von Oberflächenproteinen von Streptokokken

Streptokokken-Oberflächentprotein wurde durch Mutanolysin-Behandlung nach einer Methode von Siegel et al. (1981) isoliert. Die Bakterien wurden nach 18 Stunden Bebrütung bei 37 °C in Iso-Sensitest-Bouillon geerntet, mit PBS, 0,005 M EDTA und Aqua dest. gewaschen und in 0,02 M Tris-HCl, pH 6,8, mit 30% Raffinose und 0,001 M $MgCl_2 \times 6 H_2O$ aufgenommen. Zu der Suspension, die eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm von 2,3 bis 2,6 aufwies, wurden 60 U/ml Mutanolysin (Sigma, St. Louis) hinzugefügt. Inkubiert wurde die Suspension für 18 Stunden bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Nach Abzentrifugation der Protoplasten bei 14500 g für 30 Minuten wurde der Überstand in einer Amicon-Kammer unter N_2 -Druck einkonzentriert und anschließend lyophilisiert. 40 mg des Oberflächenprotein-Extraktes wurde auf einer Sephacryl S-200 Säule (2,6 x 108 cm) aufgetragen und mit 0,1 M Ammoniumbicarbonat, pH 8,2, bei einer Flußrate von 20 ml/h eluiert.

2.17. Enzymatische Spaltung von Streptokokken-Oberflächenproteinen

2.17.1. Pepsin-Extraktion von Streptokokken-Oberflächenproteinen

Die Pepsin-Extraktion der Streptokokken-Oberflächenproteine wurde nach Beachy et al. (1977) durchgeführt. Die Streptokokken wurden in 18 l Iso-Sensitest-Bouillon 18 Stunden bei 37 °C angezüchtet, bei 12800 x g abzentrifugiert, zweimal mit PBS, einmal mit 0,067 M Natrium-Kaliumphosphatpuffer, pH 5,8, gewaschen und in 55 ml 0,067 M Natrium-Kaliumphosphatpuffer, pH 5,8, aufgenommen (ca. 13 g Bakterien-Feuchtgewicht). Zu dieser

Suspension wurden 2,75 mg Pepsin (Stammlösung: 2 mg/ml gelöst in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8) hinzugefügt und 1 Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Enzymreaktion wurde abgestoppt durch Erhöhung des pH-Wertes auf 7,5 durch Zugabe von 7,5% Natriumhydrogencarbonat im Eisbad. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (Sterilfilter: 0,45 µm Porengröße, Schleicher und Schüll). Nach Dialyse gegen Wasser wurde der Rohextrakt durch Lyophilisation einkonzentriert. Die Bakterien wurden mit PBS gewaschen, auf eine OD von 1,7-1,8 bei einer Wellenlänge von 600 nm mit PBS eingestellt und in einem Ganzzell-ELISA eingesetzt.

2.17.2. Pepsin-Spaltung Mutanolysin-extrahierter Streptokokken-Oberflächenproteine

Mutanolysin-extrahierte Oberflächenproteine wurden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 5,8, aufgenommen. Pepsin wurde in einem Verhältnis von Enzym zu Substrat von 1:20 hinzugefügt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln wurde die Proteinlösung sofort bei -70 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert.

2.17.3. Trypsin-Spaltung Mutanolysin-extrahierter Streptokokken-Oberflächenproteine

Mutanolysin-extrahierte Streptokokken-Oberflächenproteine wurden in 0,05 M Ammoniumbicarbonat, pH 8,3, aufgenommen. Trypsin wurde in einem Verhältnis von Enzym zu Substrat von 1:10 hinzugefügt. Anschließend wurde die Proteinlösung für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde sofort mit 0,2 M Natrium-Carbonat-Puffer, pH 9,6, verdünnt und in einem

Protein-ELISA eingesetzt. Zum Vergleich der Reaktionen von Trypsin-behandelten und unbehandelten Streptokokken-Oberflächenproteinen mit den zu testenden Antiseren wurden Kontrollansätze mitgeführt, bei denen statt Trypsin Rinderserumalbumin im Verhältnis 1:10 eingesetzt wurde.

2.18. Immunisierung von Kaninchen

2.18.1. Immunisierung von Kaninchen mit Streptokokkenzellen

Die Immunisierung der Kaninchen mit ganzen Streptokokkenzellen wurde nach der Methode von Moody et al. (1965) durchgeführt. 500 ml Iso-Sensitest-Bouillon wurde mit 3 ml Streptokokken aus einer Vorkultur (4 ml Iso-Sensitest-Bouillon, 16 Stunden bei 37 °C) beimpft und 16-18 Stunden bei 37 °C bebrütet. Die Streptokokkenzellen wurden bei 12800 x g abzentrifugiert und in 60 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen. Diese Suspension wurde für 45 Minuten bei 56 °C im Wasserbad erhitzt. Das Immunisierungsschema wurde vollständig von Moody et al. (1965) übernommen.

2.18.2. Immunisierung von Kaninchen mit Mutanolysin-extrahierten Streptokokken-Oberflächenproteinen

1 ml komplettes Freund'sches Adjuvans wurde mit 0,5 ml 0,9% NaCl gemischt. 200 µg Mutanolysin-extrahiertes Oberflächenprotein wurde in 0,5 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen und mit der Emulsion vermischt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte subkutan. Nach 21 Tagen wurde die Impfung wiederholt. 28 Tage später wurde Kaninchenblut abgenommen und auf Antikörperaktivität getestet.

2.18.3. Absorption der gewonnenen Kaninchenserum mit einem M-Protein armen Streptokokken-Stamm

Zur Absorption von Antikörpern gegen allgemeine Streptokokken-Antigene wurden die Kaninchenserum mit Streptokokken eines M-Protein armen Gruppe A-Stammes (M52 Ref) bei 4 °C über Nacht inkubiert (nach Manjula et al. 1986). Die Bakterien wurden abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm). Die Seren wurden anschließend bei -20 °C eingefroren.

2.19. Isolierung renaler Glomerula

Renale Glomerula wurden nach einer modifizierten Methode von Misra (1972) isoliert. Gesunde Anteile einer Hypernephromiere wurden zerschnitten und zu Mus zerhackt. Dieses Mus wurde durch das erste der insgesamt drei Siebe gepreßt, das einen Porendurchmesser von 250 µm besaß. Das erste und nacheinander die anderen beiden Siebe mit einem Porendurchmesser von 180 µm und 150 µm wurden mit HBSS gespült. Die Glomerula befanden sich nach dieser Prozedur auf dem untersten Sieb mit dem kleinsten Porendurchmesser. Sie wurden abgespült und mit HBSS gewaschen. Danach wurden sie bei -70 °C eingefroren oder direkt in verschiedene Tests eingesetzt.

2.20. Isolierung glomerulärer Antigene

2.20.1. SDS-Extraktion glomerulärer Antigene

Die SDS-Extraktion glomerulärer Antigene wurde nach einer modifizierten Methode von Huang und Langlois (1985) durchgeführt. Isolierte Glomerula

wurden in demineralisiertem Wasser mit 10 mM EDTA, 10 mM N-Ethylmaleimid, 1 mM Benzamidin und 1 mM PMSF aufgenommen und bei 4 °C über Nacht stehen gelassen. Nach der Lyse wurden die Glomerula abzentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus, 2500 UpM, 4 °C, 20 Minuten) und mit Wasser gewaschen. Die lysierten Glomerula wurden eingefroren, lyophilisiert und in Probenpuffer für die SDS-PAGE-Analyse (1.3.4.) aufgenommen, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5 Minuten gekocht. Die festen Bestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand bei -70 °C eingefroren.

2.20.2. Mechanischer Aufschluß von Glomerula

Isolierte Glomerula wurden in Aqua demin. mit Aprotinin (1:200 Verdünnung einer 1 mg/ml-Lösung) für 5 Minuten im Eisbad mit einem Omnimixer (Stufe 4,5) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Glomerula mit Ultraschall dreimal für jeweils 15 Sekunden bei einer Intensität von 4 im Eisbad behandelt. Die groben Glomerula-Überreste wurden bei 4000 UpM (Minifuge RF, Heraeus) für 30 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf 10 ml mit Aqua demin. mit Aprotinin (1:200) aufgefüllt. Unlösliche Bestandteile wurden bei 110000 x g für eine Stunde bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand und das Pellet, das in 750 µl Aqua demin. mit Aprotinin (1:200) aufgenommen wurde, wurden bei -70 °C eingefroren.

2.20.3. Gelchromatographische Auftrennung löslicher renaler Proteine

Der Überstand nach Glomerula-Aufschluß wurde lyophilisiert und in 500 µl PBS aufgenommen und durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße filtriert. 400 µl dieses Filtrats (ca. 2,5 mg Protein) wurden auf eine Superose 12-Säule aufgetragen (Säulenvolumen: 24,3 ml, FPLC-Pharmacia) und mit PBS

als Elutionspuffer aufgetrennt (Elutionsgeschwindigkeit: 0,2 ml/min, Fraktionsgröße: 0,5 ml). Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden in einem Protein-ELISA eingesetzt. Eine Eichgerade zur Bestimmung von Molekulargewichten wurde mit Hilfe von Eichläufen mit Fibrinogen (MG 340000), Alkoholdehydrogenase (MG 150000), Rinderserumalbumin (MG 66000) und Cytochrom C (MG 12800) erstellt.

2.21. Aminosäuresequenzanalyse

Die Sequenzierung von Peptiden im pMol-Bereich erfolgte auf einem Gasphasen-Sequencer (ABI 470A) mit Online Detektion (ABI 120) zur Identifizierung der beim Edman Abbau des Peptides abgespaltenen PTH-Aminosäuren (Tarr, 1986). Bei der Sequenzierung findet das ABI 03 RPTH-Programm Anwendung. Das zu sequenzierende Peptid wurde in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet und in 60 µl Ameisensäure (50% v/v) gelöst. Das Peptid wurde auf einen mit Polypropylen beschichteten Glasfaserträger aufgetragen und sequenziert.

2.22. PTC-Aminosäureanalyse

Die PTC-Aminosäureanalyse wird zur Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen und Peptiden durchgeführt. Aliquots der zu untersuchenden Peptide wurden im Vakuum getrocknet und anschließend hydrolysiert. Die Hydrolyse und Derivatisierung der Aminosäuren mit PITC wurde wie von Weber (1989) beschrieben durchgeführt. Für die Auftrennung der PTC-Aminosäuren wurde ein Applied Biosystems 130A "Microbore"-HPLC-System (ABI PTC-C₁₈-HPLC Säule, 5 µm, 220 x 2,1 mm) verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit einem kombinierten linearen und Stufen-Gradienten mit den

Lösungen A: 50 mM Na-Acetat, pH 5,4, und B: Acetonitril/H₂O 70/30 (v/v) und einer Flußrate von 300 µl/min. Die Säulentemperatur betrug 35 °C. Die Detektion der PTC-Aminosäurederivate erfolgte durch den im ABI 130A installierten Kratos Spectroflow 773 Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Chromatogramme wurden mit einem Merck-Hitachi D-2000-Integrator ausgewertet und die analysierten Aminosäuren quantifiziert.

III. Ergebnisse

1. Auswahl monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes Nierengewebe im Hinblick auf Kreuzreaktionen mit Oberflächen-Antigenen von Streptokokken der Gruppe A

1.1. Reaktion der kreuzreaktiven monoklonalen Antikörper mit menschlichem Nierengewebe

Aus monoklonalen Mausantikörpern, die mit menschlichem Nierengewebe reagierten, wurden drei Antikörper ausgewählt, die mit humanen, renalen Glomerula und mit Streptokokken der Gruppe A im Ganzzell-ELISA reagierten. Neben dem Antikörper PM II 40 H2 (PM II 40), der von Goroncy-Bermes (1987) intensiv auf seine Kreuzreaktivität mit Gruppe A Streptokokken untersucht wurde, sollte der Vergleich mit den Antikörpern PM II 62 A2 (PM II 62) und Hyp II 120 D4 (Hyp II 120) klären, ob an den beobachteten Kreuzreaktionen mehr als nur eine antigene Determinante des M-Proteins bzw. andere Proteine als das M-Protein beteiligt sind.

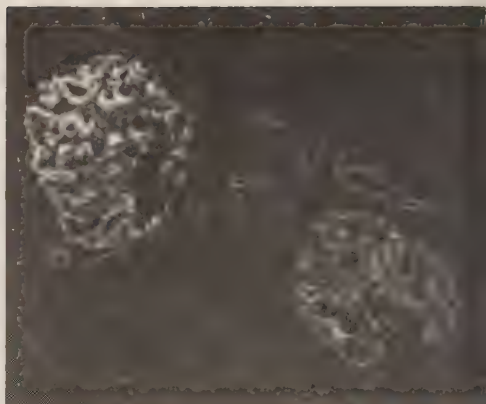
Die monoklonalen Antikörper PM II 62 und Hyp II 120 gehören ebenso wie der Antikörper PM II 40 zur IgM-Antikörperklasse. Im Immunfluoreszenztest mit menschlichen Nierengewebe reagierten sie in ähnlicher Weise mit den Glomerula wie der Antikörper PM II 40 (Abb.1).

Zur Charakterisierung der Antikörper wurde ihre Gewebsspezifität überprüft. Da die Antikörper auf Nierengewebe ein sehr ähnliches Verhalten zeigten, kann mit dem Vergleich der Antikörperreaktion mit anderen Geweben die Identität der Antikörper untereinander untersucht werden. Erkennen die Antikörper identische antigene Determinanten, so müßten sie auch in anderen Geweben ein gleiches Reaktionsmuster zeigen (Tab. 1).

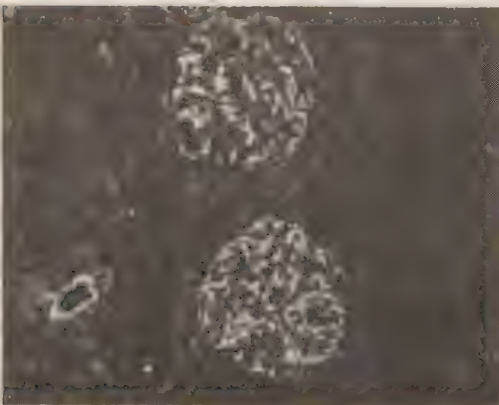
1



2



3



4



Abb. 1: Reaktion der monoklonalen Antikörper mit humanen Nierencortex im indirekten Immunfluoreszenztest.

1) PM II 40, 2) PM II 62, 3) Hyp II 120, 4) Antikörper-Enzymkonjugat-Kontrolle

Antikörperkonzentration: 15 $\mu\text{g/ml}$. x 150

Tab.1: Gewebespezifität der monoklonalen Antikörper

Humangewebe	Immunfluoreszenz		
	PM II 40	PM II 62	Hyp II 120
Nierengewebe			
Glomerula	+	+	+
Tubuli	-	-	-
Leber			
Hepatozyten	-	-	+
Darm			
Muskelgewebe	-	-	-
Zotten (Dünndarm)	-	+	+
		Interstitium	Epithel
Endothel der Blutgefäße	+	+	+

+ = positive Reaktion; - = negative Reaktion

Obwohl die Antikörper im Nierengewebe ein ähnliches Reaktionsmuster zeigten, unterschieden sie sich hinsichtlich ihrer Reaktionen mit Leber- und Darmgewebe sehr stark voneinander. Es handelt sich daher um Antikörper, die mit nicht-identischen antigenen Determinanten reagieren. Ein Unterschied zeigte sich auch in der Reaktion mit renalen Glomerula unterschiedlicher Spezies (Tab. 2).

Der Antikörper PM II 40 reagierte nur sehr schwach kreuz mit renalen Glomerula von Ratten und Meerschweinchen, während kaum Unterschiede mit den Antikörpern PM II 62 und Hyp II 120 zu sehen waren.

1.2. Reaktionen der monoklonalen Antikörper mit nativen Streptokokken

Die Methode des Ganzzell-ELISAs zur Überprüfung von Kreuzreaktionen birgt

Tab.2: Reaktion der monoklonalen Antikörper mit renalen Glomerula unterschiedlicher Spezies

Niere	Immunfluoreszenz		
	PM II 40	PM II 62	Hyp II 120
Human	++	++	++
Ratte	±	+	+++
Kaninchen	++	++	+++
Meerschweinchen	±	++	n.b.

+ = positive Reaktion, ++ = stark positive Reaktion,
 +++ = sehr stark positive Reaktion, ± = schwach positive Reaktion,
 n.b. = nicht bestimmt

gewisse Risiken. Da die Streptokokken mit Glutaraldehyd fixiert werden, ist nicht auszuschließen, daß einige sehr sensitive Determinanten durch das Fixierungsmittel zerstört werden können. Andererseits zeigten eigene Beobachtungen, daß einige Streptokokkenstämme durch diese Methode nicht genügend an die Mikrotiterplatte gebunden und dadurch bei den Waschvorgängen zum größten Teil entfernt wurden. Negative Ergebnisse mit dieser Methode können demnach nicht absolut gesehen werden. Bei der Durchführung eines Dot-Blot-Tests verringern sich die oben genannten Risiken, da die antigenen Determinanten der Streptokokken nativ erhalten bleiben (Tab.3). Eine unterschiedliche Bindungskapazität der Streptokokken an Nitrozellulose konnte nicht nachgewiesen werden.

Streptokokken der Gruppe C und G wurden neben Streptokokken der Gruppe A ausgewählt, da in diesen Gruppen Streptokokkenspezies vorkommen, die M-Protein bzw. ein M-Protein ähnliches Protein tragen (Gruppe C: *S. equi*

Tab. 3: Überprüfung der Kreuzreaktionen der gegen Nierengewebe gerichteten monoklonalen Antikörper mit nativen Streptokokken der Gruppen A, C und G in einem Dot-Blot-Test

Stamm	PM II 40	PM II 62	Hyp II 120
<u>Gruppe A</u>			
M1 Ref	++	++	++
M1 R86/436	++	++	++
M4 Ref	+	+	+
M4 Di 667	±	+	-
M5 Ref	++	++	++
M6 Ref	++	++	++
M6 BL	++	++	++
M12 Ref	++	++	++
M18 Ref	++	++	++
M19 Ref	++	++	++
M24 BL	++	++	++
M49 V-5143	±	+	-
APGN 30	+	++	-
APGN 34	+	n.b.	-
APGN 38	-	++	n.b.
APGN 40	++	++	++
APGN 44	+	++	+
TT 15	++	++	++
TT 16	-	n.b.	+
<u>Gruppe C</u>			
TT 13	++	n.b.	++
TT 14	++	++	++
TT 18	++	n.b.	++
<u>Gruppe G</u>			
APGN 24	++	++	++
APGN 31	++	++	++
APGN 25	-	n.b.	++
TT 17	++	++	++
<u>Gruppe B</u>			
TT 3	-	n.b.	-

+ = positive Reaktion, - = negative Reaktion,
 ± = schwach positive Reaktion, n.b. = nicht bestimmt

(Galan und Timoney, 1987; Woolcock, 1974) Gruppe G: (Bisno et al., 1987; Jones und Fischetti, 1987; Maxted und Potter, 1967)). Ebenso konnten Streptokokken beider Gruppen von Patienten mit akuter Poststreptokokken-Glomerulonephritis isoliert werden (Gruppe C: Barnham et al., 1983, Poon-King et al., 1967; Gruppe G: Reid et al., 1985).

Die Antikörper reagierten mit verschiedenen Stämmen aus den Gruppen A, C und G mit unterschiedlicher Intensität.

2. Untersuchungen zu den kreuzreaktiven Determinanten von Streptokokken der Gruppe A

2.1. Opsonophagozytose-Test

In den vorangegangenen Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper PM II 40 (Goroncy-Bermes, 1987) wurde durch Opsonophagozytose-Tests und Inhibierung des Antikörpers mit einem hochgereinigten Pepsinspaltprodukt des M6-Proteins, pep M6, indirekt bewiesen, daß dieser Antikörper mit M-Protein der getesteten Stämme reagierte. Die Antikörper-abhängige Opsonisierung von Gruppe A Streptokokken gilt als ein indirekter Nachweis für die Beteiligung von M-Protein an der Antigen-Antikörperreaktion; denn die antiphagozytären Eigenschaften des M-Proteins können nur durch M-Protein spezifische, opsonogene Antikörper aufgehoben werden (s.I.3.1.). Diese vermitteln die Phagozytose durch Assoziation an neutrophile Granulozyten. In diesem Test werden nur die opsonogenen Determinanten des M-Proteins erfaßt, nicht jedoch die nicht-opsonogenen. Daher schließt ein negatives Ergebnis in diesem Test nicht aus, daß der getestete Antikörper mit einer nicht-protektiven Determinanten des M-Proteins reagiert (Tab. 4).

Tab. 4: Nachweis von opsonogenen Determinanten auf Streptokokken der Gruppe A mit Hilfe der monoklonalen Antikörper in einem Opsonophagozytose-Test

% Neutrophile assoziiert mit Streptokokken				
Stamm	Kontrolle	PM II 40	PM II 62	Hyp II 120
M1 Ref	4	6	5	8
M1 R86/436	6	67	54	11
M4 Ref	5	33	5	2
M4 Di 667	11	21	15	11
M6 Ref	7	7	9	7
M6 BL	9	69	57	21
M12 Ref	9	48	33	7
M18 Ref	3	4	n.b.	7
M19 Ref	6	8	n.b.	3
M24 BL	5	21	n.b.	5
M49 V-5143	10	28	8	2

eingesetzte Antikörper-Konzentration: 1 mg/ml

Der Antikörper PM II 62 opsonisierte die gleichen Stämme der nephritogenen M-Typen 1, 6 und 12 wie der Antikörper PM II 40, der zusätzlich einen Stamm vom nephritogenen M-Typ 4 opsonisierte. Der Antikörper Hyp II 120 besaß keine opsonisierenden Eigenschaften den getesteten Stämmen gegenüber. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß er mit einer nicht-opsonogenen Determinante des M-Proteins reagiert.

2.2. Isolierung nativer Streptokokken-Oberflächenproteine

Zur näheren Charakterisierung der Antigen-tragenden Oberflächenproteine, wurden diese enzymatisch von der Streptokokkenzelloberfläche entfernt. Die in der vorangegangenen Untersuchung (Goroncy, 1987) gewählte Isolierung

rung von Oberflächenproteinen durch Säureextraktion wurde nicht benutzt, da bei dieser Methode eine Reihe von Peptidspaltprodukten entstehen. Um ein möglichst natives Oberflächenprotein zu erhalten, wurden die Streptokokken mit Mutanolysin, einer Muramidase, behandelt. Die freigesetzten Oberflächenproteine werden bei dieser Methode im Gegensatz zur Säureextraktion nicht gespalten.

Im Opsonophagozytose-Test (s. III.2.1.) fielen Stämme zweier M-Serotypen auf, M-Typ 1 und M-Typ 6, die trotz gleichen M-Typs ein unterschiedliches Opsonisierungsverhalten aufwiesen : ein Stamm, M1 R86/436 bzw. M6 BL, wird opsonisiert, der andere, M1 Ref. bzw. M6 Ref., wird nicht opsonisiert. Diese interessanten Stammpaare wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt, um eventuell strukturelle Unterschiede der M-Proteine eines Stammpaares zu erkennen.

Die Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteine wurden mit Hilfe einer Gelchromatographie an Sephacryl S-200 partiell gereinigt (Abb. 2a). Die hier nicht gezeigten Elutionsprofile der Stämme M1 Ref, M6 Ref und M6 BL unterschieden sich nicht wesentlich von dem dargestellten. Die vereinigten Fraktionen wurden im ELISA auf das Vorhandensein von Antigenen überprüft, die mit dem Antikörper PM II 40 reagieren (Abb. 2b). Die positiv reagierenden Fraktionen wurden ebenfalls im ELISA mit den übrigen Antikörpern getestet (Tab. 5).

Es zeigte sich, daß in diesen Fraktionen Oberflächenproteine zu finden sind, die mit allen drei Antikörpern reagieren. Zur Überprüfung der Avidität zu den isolierten Oberflächenproteinen wurde der Antikörper PM II 40 mit diesen vorinkubiert und danach in einem Ganzzell-ELISA mit Streptokokken des Stammes M1 Ref eingesetzt (Tab. 6). Die Antikörper-

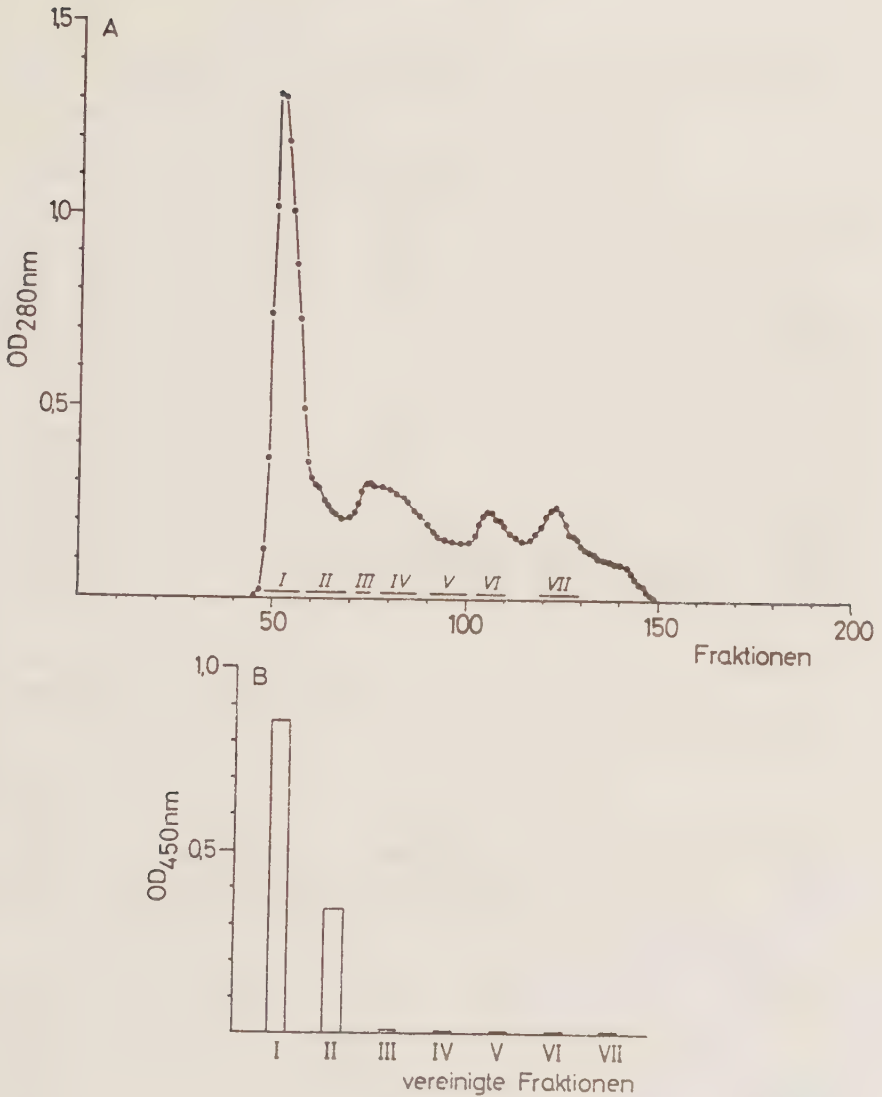


Abb. 2: A) Gelchromatographie von Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen des Stammes M1 R86/436 an Sephacryl S-300.

B) Reaktion des Antikörpers PM II 40 mit den vereinigten Fraktionen der Gelchromatographie im ELISA.

eingesetzte Antikörperkonzentration: 5 µg/ml
eingesetzte Proteinmenge: 10 µg/ml

Tab. 5: ELISA mit Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen

Stamm/ Fraktion	monoklonale Antikörper		
	PM II 40	PM II 62	Hyp II 120
M1 Ref/ 48-55	1: 64	1:32	1:64
M1 R86/436/ 48-58	1: 64	1:32	1:64
M6 Ref/ 52-59	1: 2	1:64	n.b.
M6 BL/ 49-62	1:128	1:64	1:64

Anfangsantikörper-Konzentration von 80 µg/ml in Zweier-Schritten verdünnt.

Angegeben ist die Antikörperverdünnung, bei der eine Extinktion von 0,25 bei einer Wellenlänge von 450 nm erreicht wurde.

reaktion mit den Bakterien wurde von allen getesteten Oberflächenproteinen inhibiert.

Tab. 6: Ganzzell-ELISA mit dem Stamm M6 BL und dem mit den isolierten Streptokokken-Oberflächenproteinen vorabsorbierten monoklonalen Antikörper PM II 40

Antikörper- Konzentration	% verbliebene Bindung			
	Oberflächenproteine			
	M1 Ref	M1 R86/436	M6 Ref	M6 B1
1,25 µg/ml	40	54	31	26

Inhibitorkonzentration: 200 µg/ml

2.3. Darstellung der Streptokokken-Oberflächenproteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Immunoblot

Zur Darstellung der partiell gereinigten Oberflächenproteine der vier Stämme wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gewählt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung zeigte es sich, daß das Proteinmuster der beiden M1-Stämme recht einheitlich ist, während sich diejenigen der M6-Stämme stark voneinander unterscheiden (Abb. 3). Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose und Entwicklung des Western-Immunoblots mit dem Antikörper PM II 40 reagierte, einheitlich für die M1-Stämme, ein Proteincluster mit einem Molekulargewicht von 52-45 kD. Die M6-Stämme unterschieden sich deutlich voneinander. Die kreuzreaktiven Proteine des Stammes M6 BL lagen in Molekulargewichtsbereichen von 58-53, 50-47, und 37-32 kD, während der Stamm M6 Ref nur ein kreuzreaktives Protein aufwies, daß ein Molekulargewicht von 52 kD hatte. Der Western-Immunoblot des Stammes M6 Ref wurde parallel dazu mit einem Serum gegen ein hochgereinigten Pepsinspaltprodukt des M-Proteins vom M-Typ 6 entwickelt. Dieses hochspezifische Antiserum gegen M-Typ 6-Protein wurde eingesetzt, um zu untersuchen, ob das mit dem Antikörper PM II 40 reagierende Protein identisch ist mit M-Protein. Mit dem Antiserum wurde das gleiche Protein nachgewiesen wie mit dem monoklonalen Antikörper PM II 40, so daß eine Identität des Proteins zumindestens im Molekulargewicht mit M-Protein nachgewiesen wurde. Ein Vergleich der Molekulargewichte der kreuzreagierenden Proteine der vier Stämme mit den M-Protein Molekulargewichten der von Fischetti et al. (1985) beschriebenen, mit Phagenlysin extrahierten M-Proteine, unterstützt ebenfalls die Hinweise von Goroncy-Bermes (1987), daß M-Protein das kreuzreagierende Antigen der Streptokokken ist.

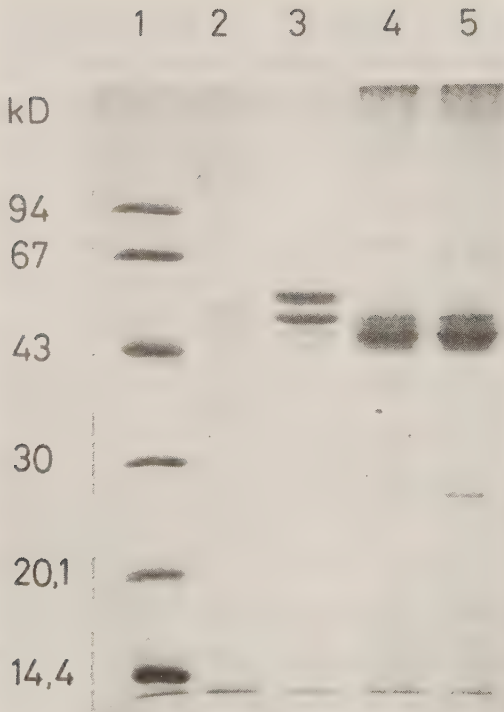


Abb. 3: Darstellung der Mutanolysin-extrahierten Streptokokken-Oberflächenproteine.

A) SDS-PAGE nach Comassie-Blau-Färbung

1) Standard, 2) M6 Ref, 3) M6 BL, 4) M1 Ref, 5) M1 R86/436

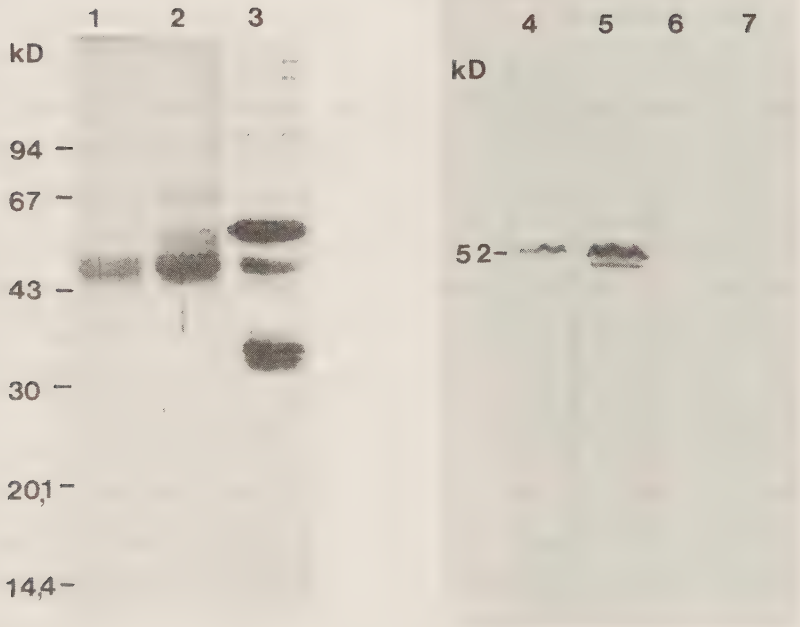


Abb. 3: Darstellung der Mutanolysin-extrahierten Streptokokken-Oberflächenproteine.

B) Western-Immunoblot entwickelt mit dem Antikörper PM II 40 (15 µg/ml)
1) M1 Ref, 2) M1 R86/436, 3) M6 BL, 4) M6 Ref entwickelt mit dem Antiserum α-pep M6-Serum (1:1200), 6) M6 Ref entwickelt mit Präimmunserum (1:1200), 7) Enzym-Konjugat-Kontrolle

Die beiden anderen Antikörper PM II 62 und Hyp II 120 erkannten die gleichen Proteine im Western-Immunoblot wie der Antikörper PM II 40.

3. Nachweis der Immunogenität der Mutanolysin-extrahierten Streptokokken-Oberflächenproteine

Zur M-Typisierung von Streptokokken der Gruppe A werden Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit Streptokokkenzellen eines bestimmten M-Typs gewonnen. Dieses Serum wird mit einem heterologen Stamm absorbiert, um Antikörper gegen allgemeine Streptokokkenantigene zu entfernen. Diese Methode zur Herstellung typenspezifischer Antiseren sollte mit Antiseren, die durch Immunisierung mit isolierten Oberflächenproteinen gewonnen wurden, verglichen werden, um deren Fähigkeit zur Induktion typenspezifischer Antikörper zu testen.

Kaninchen wurden mit den isolierten Oberflächenproteinen der mit PM II 40 opsonisierbaren Stämme M1 R86/436 und M6 BL, sowie mit ganzen Streptokokken der nichtopsonisierbaren Stämme M1 Ref und M6 Ref immunisiert. Die Kaninchenserum wurden im Western-Immunoblot (Abb.4) und im Opsonophagozytose-Test (Tab.:7) auf Antikörper gegen isolierte Streptokokken-Oberflächenproteine bzw. gegen ganze Bakterien untersucht.

Antikörper gegen isolierte Oberflächenproteine ließen sich in den Kaninchen- α -M6 BL-, α -M1 Ref- und α -M1 R86/436-Seren nachweisen, im Kaninchen- α -M6 Ref-Serum hingegen nicht. Dieses Serum reagierte im ELISA mit isolierten Streptokokken-Oberflächenproteinen nur schwach (Daten nicht gezeigt).

Für den Opsonophagozytose-Test wurde eine positive Opsonisierung postuliert, wenn die Assoziation der Streptokokken mit Neutrophilen mit Antikörpern mindestens 20% höher als die Negativkontrolle ist (s. II.2.10.). Vergleicht man nun die Ergebnisse der isolierten Oberflächenproteine mit denen des Opsonophagozytose-Tests ($K = 3\%$, α -M6 Ref-Serum mit M6 Ref =

Tab. 7: Opsono-Phagozytose-Test mit Kaninchenserum gegen Streptokokken-Oberflächenproteine

----- % PMN assoziiert mit Bakterien Kaninchenserum -----					
Stamm	α -M6 Ref	α -M6 BL	α -M1 Ref	α -M1 R86/436	K
M1 Ref	13	7	82	50	8
M1 R86/436	7	8	78	81	13
M6 Ref	27	10	10	10	3
M6 BL	18	17	76	74	9
M12 Ref	28	n.b.	82	n.b.	11

n.b. = nicht bestimmt

27% PMN assoziiert mit Streptokokken), so besitzt das α -M6 Ref-Serum trotz niedrigem Antikörper-Titer opsonisierende Eigenschaften für M6 Ref. Außer dem Kaninchen- α -M6 BL-Serum besaßen die beiden Kaninchen- α -M1-Seren ebenso opsonisierende Eigenschaften, die sich nicht nur auf M-Typ 1 Stämme beschränkte.

Im Western-Immunoblot (Abb.4) wird deutlich, daß durch die Immunisierung mit isolierten Proteinen wesentlich mehr antigene Determinanten zugänglich sind, als bei der Immunisierung mit ganzen Streptokokken. Während das α -M1 Ref-Serum, das mit ganzen Streptokokken gewonnen wurde, nur eine begrenzte Anzahl an Proteinen der isolierten Oberflächenproteine erkennt, reagiert das gegen isolierte Oberflächenproteine gewonnene α -M1 R86/436-Serum mit wesentlich mehr Proteinen, obwohl beide Stämme das gleiche Oberflächenproteinmuster zeigen (s. III.Abb.3). Auffallend ist, daß das α -M1 Ref-Serum fast ausschließlich mit Proteinen reagiert, die ebenfalls mit den monoklonalen Antikörpern reagieren.

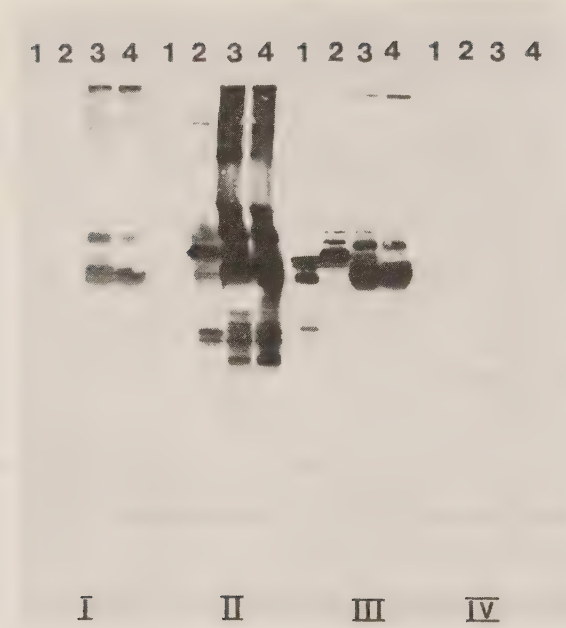


Abb. 4: Western-Immunoblot mit Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen der Streptokokken und Kaninchenantisera.

1) M6 BL, 2) M6 Ref, 3) M1 R86/436, 4) M1 Ref
Kaninchenantiserum (Verdünnung 1:1200): I) α -M1 Ref,
II) α -M1 R86/436, III) α -M6 BL, IV) α -M6 Ref

Zusammenfassend ist zu sagen, daß nicht nur Streptokokkenzellen immunogen sind, sondern auch die isolierten Oberflächenproteine, wobei im Falle des M-Typs 1 auch die Produktion opsonogener Antikörper stimuliert wurde, die mit M-Protein reagieren.

4. Lokalisation der antigenen Determinanten

4.1. Pepsin-Spaltung von Streptokokken-Oberflächenproteinen

4.1.1. ELISA mit Pepsin-behandelten Streptokokken und deren Überstände nach Pepsinbehandlung

Die bisherigen Ergebnisse sprechen für M-Protein als Antigen der monoklonalen Antikörper PM II 40 und PM II 62. Sie opsonisieren einige der Gruppe A-Streptokokken (s. III.2.1.), eine Eigenschaft, die nur Antikörpern gegen M-Protein zugestanden wird, sie reagieren mit den gleichen Proteinen, die die M-Protein spezifischen Seren α -pep M6 und α -M1 Ref erkennen (s. III.2.3., III.3.), und sie können durch das hochgereinigte Pepsinspaltprodukt des M-Typ 6 Proteins inhibiert werden (PM II 40: Goroncy, 1987, PM II 62: 77% Inhibition der Antikörperreaktion (Antikörperkonzentration: 2,5 μ g/ml) mit dem Stamm M6 BL im Ganzzell-ELISA bei einer Inhibitorkonzentration von 200 μ g/ml pep M6). So erschien es sinnvoll, die antigenen Determinanten dieser Antikörper auf dem M-Protein zu lokalisieren.

In der Literatur wird häufig die Gewinnung von M-Protein bzw. M-Protein-Peptiden durch limitierte Pepsinspaltung beschrieben. Dabei wirkt das Pepsin unter suboptimalen Bedingungen (pH 5,8) eine begrenzte Zeit auf ganze Streptokokken ein. Das M-Protein besitzt eine hypersensible Region für Pepsin, die sich ungefähr in der Mitte des nativen Proteins befindet, so daß bevorzugt an dieser bestimmten Stelle gespalten wird. Die aminoterminaler Hälfte des M-Proteins befindet sich danach im Überstand, während der C-terminale Bereich an den Streptokokken verbleibt. Diese limi-

tierte Pepsinspaltung des M-Proteins wurde eingesetzt, um die antigenen Determinanten der verschiedenen Antikörper auf dem Protein einzugrenzen.

Zur Lokalisation der antigenen Determinanten wurden die vier Stämme ausgewählt, deren Oberflächenproteine isoliert worden sind. Das Vorhandensein von antigenen Determinanten auf der C-terminalen Hälfte des M-Proteins wurde im Ganzzell-ELISA mit den Streptokokken, die mit Pepsin vorbehandelt wurden, untersucht (Abb.5a,b).

Durch die Behandlung der Bakterien mit Pepsin verringern sich die Bindungsaktivitäten der Antikörper PM II 40 und PM II 62 für die verschiedenen Stämme wesentlich. Dabei bildet der Stamm M6 BL eine Ausnahme, da die Antikörperbindungsfähigkeit an Pepsin-behandelten Bakterien dieses Stammes kaum vermindert wird. Selbst nach zweistündiger Pepsineinwirkung konnte keine wesentliche Verringerung beobachtet werden. Einen geringeren Antikörperreaktionsverlust als mit den anderen Stämmen zeigt der Antikörper PM II 62 auch noch mit dem Stamm M1 Ref.

Kaum von der Pepsinbehandlung der Streptokokken beeinflusst ist die Reaktion des Antikörpers Hyp II 120. Das Ergebnis aus dem ELISA mit Pepsin-extrahierten Oberflächenproteinen (Tab.8) und dem Antikörper Hyp II 120 bestätigt dies, da keine Reaktion mit den abgespaltenen Proteinen nachzuweisen ist. Der Antikörper PM II 62 reagiert im Unterschied zu Hyp II 120 mit den Pepsin-extrahierten Oberflächenproteinen aller vier Stämme, obwohl er kaum in seiner Bindungsfähigkeit mit den Pepsin-behandelten Stämmen M1 Ref und M6 BL beeinträchtigt war.

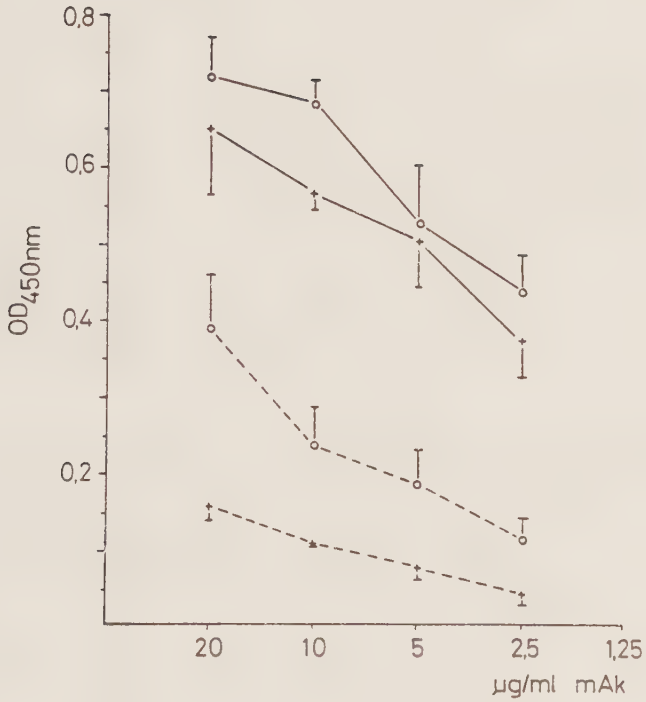


Abb. 5a: Reaktion des Antikörpers PM II 40 in einem Ganzzell-ELISA mit Streptokokken des M-Typs 1 vor und nach Pepsinbehandlung.

- + + M1 R86/436
- o o M1 Ref
- unbehandelt
- - limitiert Pepsin-behandelt

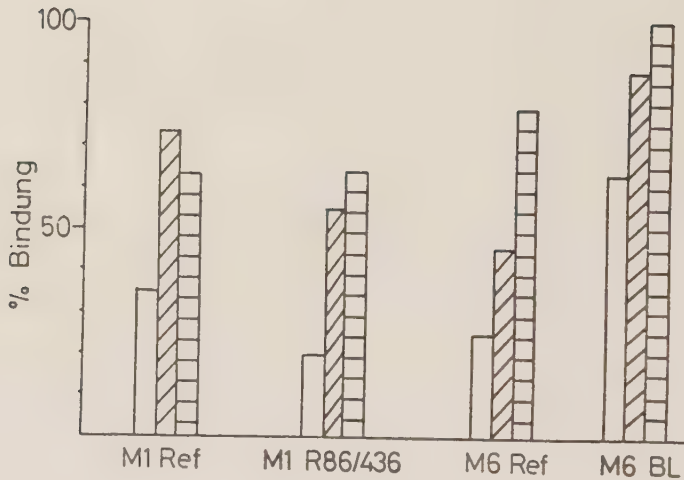


Abb. 5b: Antikörperbindung nach limitierter Pepsinextraktion ganzer Streptokokken im Vergleich mit unbehandelten Streptokokken im Ganzzell-ELISA.

Aufgetragen ist die verbliebene Antikörperbindung nach limitierter Pepsinbehandlung der Stämme M1 Ref, M1 R86/436, M6 Ref und M6 BL.



Eingesetzte Antikörperkonzentration (10 µg/ml)
Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen

Tab.8: ELISA mit Pepsin-extrahierten Oberflächenproteinen

Antikörper	Stamm			
	M1 Ref	M1 R86/436	M6 Ref	M6 BL
PM II 40	1:16	1:16	1: 2	1: 4
PM II 62	1:16	1:32	1:16	1:32
Hyp II 120	0	0	0	0

Aufgetragen sind die Verdünnungsstufen einer 80 µg/ml Antikörperlösung bei einer OD_{450nm} = 0,25 (auf-bzw. abgerundet).
Eingesetzte Proteinkonzentration: 10 µg/ml

Antigene Determinanten erkennt der Antikörper PM II 40 vor allem von Pepsin-extrahierten Oberflächenproteinen der Stämme M1 Ref und M1 R86/436, sehr viel schwächer von den M-Typ 6-Stämmen.

Diese Ergebnisse lassen Aussagen über vermutliche Lokalisationen der antigenen Determinanten, die die monoklonalen Antikörper erkennen, auf dem M-Protein zu, die unter IV diskutiert werden.

4.1.2. Darstellung der Pepsin-extrahierten Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Im ELISA mit limitiert Pepsin-extrahierten Oberflächenproteinen reagierten Peptide mit den Antikörpern PM II 40 und PM II 62 (III.4.1.1. Tab.8). Diese Peptide wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Parallel zu einer Coomassie-Färbung (Abb.6a) wurde ein Western-Immunoblot mit den Peptiden durchgeführt, um die mit den Antikörpern-reagierenden Peptide darzustellen (Abb.6b).

Ähnlich dem Proteinmuster nach Mutanolysin-Extraktion (III.2.3. Abb.3) unterscheidet sich das Peptidmuster nach limitierter Pepsin-Extraktion der beiden M-Typ 1 Stämme nicht voneinander, während es sich innerhalb der M-Typ 6-Stämme stark unterscheidet. Nur der Antikörper PM II 40 reagierte mit Peptiden der M-Typ 1 Stämme, die ein kleineres Molekulargewicht aufwiesen als die kreuzreagierenden Proteine nach Mutanolysin-Extraktion. Peptide der M-Typ 6 Stämme zeigten keine Reaktion. Der Einfluß von SDS in der SDS-PAGE scheint sich entschieden negativ auf die mit PM II 62 reagierenden antigenen Determinanten der Pepsin-extrahierten Proteine ausgewirkt zu haben, da sie trotz einer stark ausgeprägten Kreuzreaktion im ELISA mit PM II 62 (III.4.1.1. Tab.8) im Western-Immunoblot nicht reagierten.

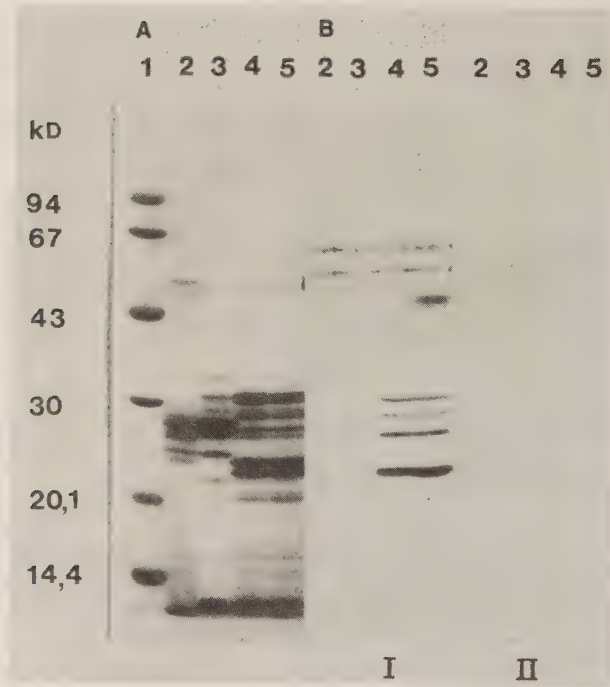


Abb. 6: Darstellung der Pepsin-extrahierten Oberflächenproteine von Streptokokkenzellen.

A) SDS-PAGE nach Coomassie-Blau Färbung. 1) Standard, 2) M6 Ref, 3) M6 BL, 4) M1 Ref, 5) M1R86/436

B) Western-Immunoblot entwickelt mit I) PM II 40, II) PM II 62, 2) M6 Ref, 3) M6 BL, 4) M1 Ref, 5) M1 R86/436.
Eingesetzte Antikörperkonzentration: 20 µg/ml.

4.2. Limitierte Pepsinspaltung von Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen

Es erschien interessant, die für ganze Bakterien angewendete limitierte Pepsinspaltung auch auf die nativen Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteine anzuwenden. Sollten die Antikörper im Mutanolysin-Extrakt mit

demselben Protein reagieren wie mit dem im Pepsin-Extrakt, so sollte auch nach limitierter Pepsinspaltung der Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen ähnliche Spaltprodukte entstehen. Da normalerweise Proteine in Lösungen leichter zugänglich für Enzyme sind als Proteine an ganzen Bakterien, ist nicht zu erwarten, daß genau das gleiche Spaltmuster nachgewiesen wird, jedoch sollten sich ein oder mehrere Hauptspaltprodukte nachweisen lassen.

Nach 30 minütiger Pepsineinwirkung auf Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen der M-Typ 1 Stämme, konnte im Western-Immunoblot ein 23 kD Peptid nachgewiesen werden, das mit dem Antikörper PM II 40 reagierte, mit den beiden anderen Antikörpern PM II 62 und Hyp II 120 jedoch nicht (Abb.7). Dieses 23 kD Peptid wurde auch nach limitierter Pepsinspaltung ganzer Bakterien gefunden (s. III.4.1.2. Abb.6a,b).

5. Reinigung und Identifizierung des Pepsin-extrahierten 23 kD Peptids der M-Typ 1 Stämme

Als Hauptprodukt nach limitierter Pepsineinwirkung auf M-Typ 1 Streptokokkenzellen und Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen, das mit dem Antikörper PM II 40 reagierte und dessen Molekulargewicht ungefähr die Hälfte dessen des M1-Proteins beträgt, wurde ein 23 kD Peptid identifiziert. Dieses Peptid wurde daher ausgewählt, um zu beweisen, daß es sich hierbei um ein Peptid des M-Proteins handelt.

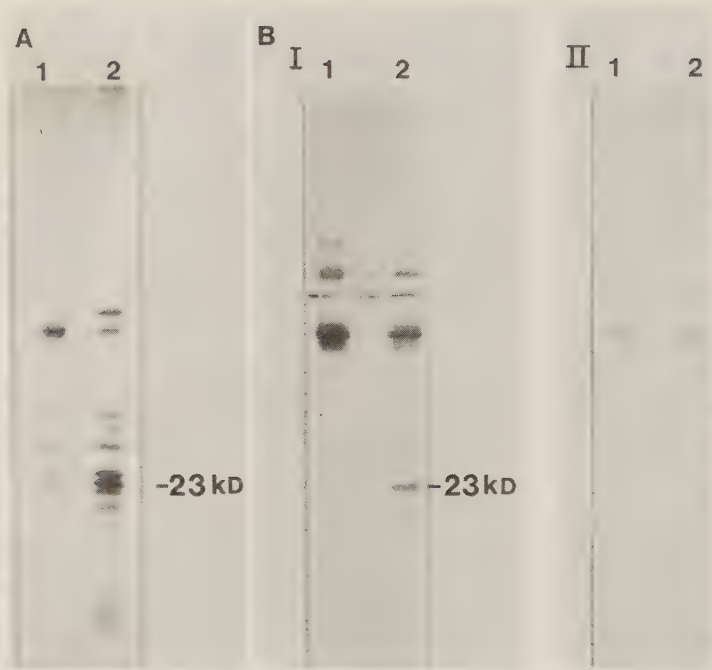


Abb. 7: Limitierte Pepsinspaltung von Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen des Stammes M1 R86/436.

- A) SDS-PAGE der Pepsinspaltprodukte der isolierten Oberflächenproteine nach Coomassie-Blau Färbung
- B) Western-Immunoblot entwickelt mit: I) PM II 40, II) PM II 62
1) 5 Minuten Pepsineinwirkung, 2) 30 Minuten Pepsineinwirkung

5.1. Reinigung des 23 kD Peptids

Der primäre Aufbau eines Proteins wird durch seine Nukleinsäuresequenz bzw. seine Aminosäuresequenz beschrieben. Proteine mit gleicher Aminosäuresequenz sind identisch. Da die Aminosäuresequenz für das M1-Protein in der Literatur beschrieben wurde, erschien es sinnvoll eine Aminosäure-

sequenzierung des 23 kD-Peptids durchzuführen, um die Identität des Peptids mit dem M1-Protein nachzuweisen.

Für die Reinigung des 23 kD Peptids wurde eine SDS-PAGE anderen chromatographischen Methoden vorgezogen, da das Peptid in einem Schritt vollständig von den übrigen Spaltprodukten getrennt werden konnte. Nach Elektrolution des 23 kD Peptids aus dem Gel und einer zweiten Gelelektrophorese zur Abtrennung der in der Aminosäuresequenzierung störenden Glycin- und Tris-Bestandteile wurde die Reinheit des Eluats in einer SDS-PAGE überprüft. Gleichzeitig wurde ein Western-Immunoblot mit dem Antikörper PM II 40 durchgeführt, um sicherzustellen, ob das gereinigte Peptid mit dem Antikörper reagiert (Abb.8). Es konnten keine weiteren Proteinbanden

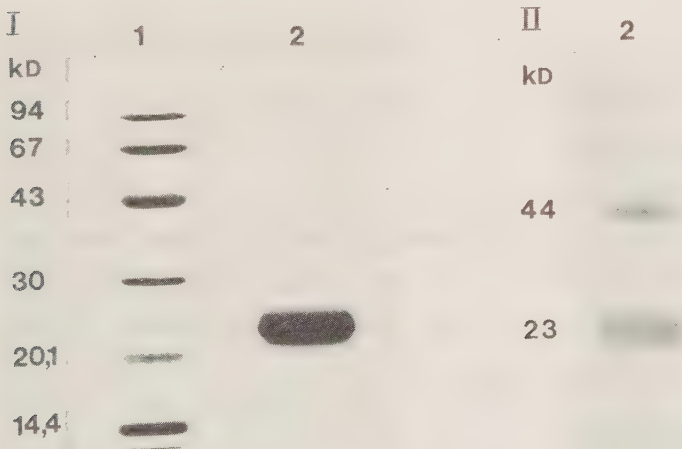


Abb. 8: Reinheitsüberprüfung des elektroeluierten 23 kD Pepsinspaltprodukts des Stammes M1 R86/436.

I) SDS-PAGE nach Coomassie-Blau Färbung, II) Western-Immunoblot entwickelt mit PM II 40 (20 µg/ml).

1) Standard, 2) 23 kD Pepsinspaltprodukt

als die des 23 kD Peptids nachgewiesen werden, das nach wie vor mit dem Antikörper PM II 40 reagierte. Eine Protein-Bande mit einem Molekulargewicht von ungefähr 44 kD, ist eindeutig aus der 23 kD-Bande hervorgegangen und stellt anscheinend ein Dimer dieses Peptids dar.

Bei der Reinigung von Proteinen mittels Gelelektrophorese muß beachtet werden, daß Proteine, die nur eine einzige Bande in der SDS-Page ergeben, nicht identisch sein müssen, da Proteine mit demselben Molekulargewicht nicht aufgetrennt werden. Zur Überprüfung der Reinheit eines geleluierten Proteins können die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte von Proteinen beitragen. Während einer isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine in einem pH-Gradienten nach ihren isoelektrischen Punkten aufgetrennt.

Das 23 kD Peptid wurde nach Elektroelution in einer isoelektrischen Fokussierung eingesetzt (Abb.9). Außer einem Bandencluster wurden keine weiteren Banden sichtbar. Die Bandencluster eines Proteins beruhen darauf, daß einige Aminosäuren oxidiert vorliegen, so daß sich der isoelektrische Punkt des Proteins geringfügig ändert. Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß das 23 kD Peptid aus einem einzigen Peptid besteht. Der isoelektrische Punkt für das 23 kD Peptid des M1 R86/436 Stammes beträgt 5,6 und für das Peptid des Stammes M1 Ref 5,5.

5.2. Identifizierung des 23 kD Peptids des Stammes M1 R86/436

Die Aminosäuresequenzierung des isolierten 23 kD-Peptids des Stammes M1 R86/436 wurde mit Hilfe eines Gasphasen-Sequenzers bestimmt. Die eingesetzte Menge betrug 342,2 pmol Protein, die Menge nach jedem Zyklus betrug 89,3%.

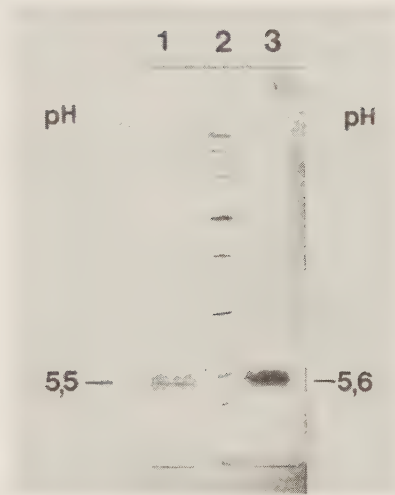


Abb. 9: Isoelektrische Fokussierung des isolierten 23 kD Peptids nach limitierter Pepsinspaltung.

1) M1 Ref, 2) Standard, 3) M1 R86/436
Coomassie-Blau Färbung

Die ersten zwanzig Aminosäuren des 23 kD Peptids lauten:

V-A-G-R-D-F-K-R-A-E-E-L-E-K-A-K-Q-A-L-E

V-A-G-R-D-F-K-R-A-E-E-L-E-K-A-K-Q-A-L-E (1)

L-E-N-A-M-E-V-A-G-R-D-F-K-R-A-E-E-L-E-K-A-K-Q-A-L-E (2)

Die ermittelte Aminosäuresequenz des 23 kd-Peptids ist identisch mit den veröffentlichten Aminosäuresequenzen für das M1-Protein von Kraus et al. (1987)(2), die ein pep M1-Protein mit einem Molekulargewicht von 23,5 kd untersuchten, und von Morávek et al. (1986)(1), die ein pep M1-Protein

mit einem Molekulargewicht von 20 und 27 kD beschrieben. Anscheinend fehlt der erste Teil des N-terminalen Endes des 23 kD Peptids.

Mit dieser Aminosäuresequenz-Analyse konnte eindeutig bewiesen werden, daß der Antikörper PM II 40 mit dem M-Protein der Streptokokken reagiert.

6. Darstellung des glomerulären Antigens

6.1. Isolierung der Glomerula

Der Nachweis der glomerulären Antigene aus einem Gesamtnierencortex-Homogenat erwies sich als stark präparationsabhängig. Das von Goroncy-Bermes (1987) beschriebene 43 kD Protein konnte auf diese Weise nur schwer nachgewiesen werden. Es blieb außerdem fragwürdig, ob dieses mit dieser Methode gewonnene Protein aus den Glomerula oder aus anderen Bestandteilen der Niere stammte. Daher wurden alle nachfolgenden Versuche an isolierten Glomerula durchgeführt.

Die durch graduelles Sieben gewonnenen Glomerula waren zum größten Teil nicht mehr von der Bowman'schen Kapsel umschlossen. In dieser Fraktion konnten außer Glomerula nur noch die Kapselreste und einige wenige Tubulireste nachgewiesen werden.

In einem Immunfluoreszenztest wurde überprüft, ob das glomeruläre Antigen nach dem graduellen Sieben noch erhalten war (Abb.10a). Das Immunfluoreszenzbild gleicht dem vom Nierencortexschnitt (III.1.1. Abb.1), wobei am nativen, isolierten Glomerulum deutlich wird, daß der Antikörper PM II 40

Zellen mit stark verzweigten Ausläufern erkennt (Abb. 10b). Mit den anderen Antikörpern wurde ein ähnliches Bild erhalten.

6.2. SDS-Extraktion von Proteinen aus isolierten Glomerula

Ausgehend von dem Gedanken, daß es sich bei dem mit dem Antikörper reagierenden Protein um ein Membranprotein handeln könnte, wurden verschiedene nichtionische Detergenzien ausgetestet, um das Protein aus der Membran zu lösen. Zuvor wurden die Glomerula in Wasser aufgenommen, um sie zu lysieren. Der Versuch, die Antigene aus isolierten Glomerula mit nichtionischen Detergenzien, wie Triton X-100, NP 40 oder Triton X-114, zu extrahieren, erwies sich als ineffektiv. Im Gegensatz zu der Extraktion isolierter Glomerula mit SDS wurden Proteine mit nichtionischen Detergenzien nur in geringer Konzentration freigesetzt. Da im Western-Immunoblot (Abb.11b) mit SDS-Extrakten mit dem Antikörper PM II 40 immunreaktive Proteine nachgewiesen werden konnten, wurde diese Methode zur Freisetzung glomerulärer Proteine gewählt.

In der SDS-PAGE lassen sich Proteinbanden unterschiedlichster Größe darstellen (Abb.11a). Nach Blotten dieser Proteine auf Nitrozellulose reagierten nur bestimmte Proteine mit den drei monoklonalen Antikörpern (Abb.11b). Das Erkennungsmuster der Antikörper unterscheidet sich kaum voneinander. Deutlich reagieren Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 55, 50 und 43 kD. Diese Proteine findet man mehr oder minder stark ausgeprägt in Glomerulaextrakten unterschiedlicher menschlicher Nieren (Tab.9).

Das unregelmäßige Auftreten von Proteinen höherer oder niedrigerer Mole-

A



B



C



Abb. 100 Reaktion des Antikörpers PM II 40 mit isolierten Glomerula im indirekten Immunfluoreszenztest.

A) Übersicht. x 150, B) Detailaufnahme am Kapillarrand.
x 940, C) Antikörper-Enzymkonjugat-Kontrolle

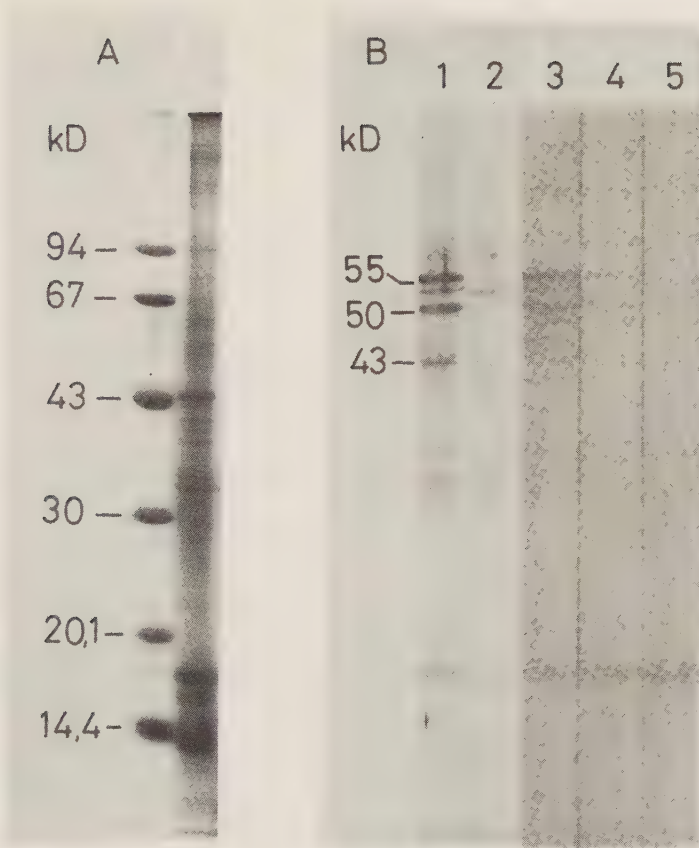


Abb. 11: SDS-extrahierte glomeruläre Proteine.

A) SDS-PAGE nach Coomassie-Blau Färbung

B) Western-Immunoblot entwickelt mit: 1) PM II 40,
3) PM II 62, 4) Hyp II 120, 2)+5) Antikörper-Enzymkonjugat-Kontrollen. Eingesetzte Antikörperkonzentration: 15 µg/ml

Tab.9: Reaktion von SDS-Extrakten isolierter Glomerula im
Western-Immunoblot mit dem Antikörper PM II 40

Niere 1	Niere 2	Niere 3
(79,5)		
(74,0)		
(71,0)		
		61,0
	(64,0)	(62,0)
57,0		
54,5	55,0	55,0
(50,5)	50,5	49,5
(46,5)	(48,0)	(46,5)
(43,0)	(43,0)	(43,0)
	(41,5)	(41,0)
		(37,0)

()= schwache Banden

kulargewichte könnte im Zusammenhang mit proteolytischen Abbau der Proteine zu sehen sein.

6.3. Charakterisierung der glomerulären Antigene

6.3.1. Aufschluß isolierter Glomerula

Die vollständige Lyse der glomerulären Zellen mit Wasser ließ sich nicht nachweisen. Da im H₂O-Überstand eine geringe Proteinkonzentration vorlag, wurden vermutlich nicht alle Cytoplasmaproteine freigesetzt. Daher wurde ein mechanischer Aufschluß der Glomerula mit Hilfe einer Omni-Mixer- und Ultraschall-Behandlung vorgenommen. Mit einer niedrigtourigen Zentrifugation (3200 UpM) wurden große Zelltrümmer und Basalmembran-Fragmente

pelletiert (P0). Der Überstand wurde mit Hilfe einer Ultrazentrifugation von Membranbestandteilen befreit. In dem Pellet (P1) konnten elektronenmikroskopisch Membranvesikel nachgewiesen werden, aber auch diffuse Aggregate, die auf unlösliches Protein hindeuten. Sowohl dieses Pellet (P1) als auch der verbliebene Überstand (Ü1) wurden auf eventuell vorhandene Antigene untersucht, wobei in Anbetracht des nur in begrenzter Menge zur Verfügung stehende Untersuchungsmaterials nur der eindeutig mit M-Protein von Streptokokken kreuzreagierende Antikörper PM II 40 zur Suche nach den antigenen Determinanten eingesetzt wurde (Tab.10, Abb.12).

Tab.10: Reaktionen der glomerulären Proteine nach Aufschluß der Glomerula mit dem Antikörper PM II 40

	ELISA*	Dot-Blot+	Western-Immunoblot
Ü1	0,150	+	(40 kD)
P1	0,027	-	(60 kD) 50 kD 47 kD (43 kD) (40 kD)
P1 nach 8 M Urea Extraktion	0,469		

* eingesetzte Proteinkonzentration: 10 µg/ml

+ eingesetzte Proteinmenge: 6 µl

eingesetzte Antikörper-Konzentration: 20 µg/ml

() = schwache Banden

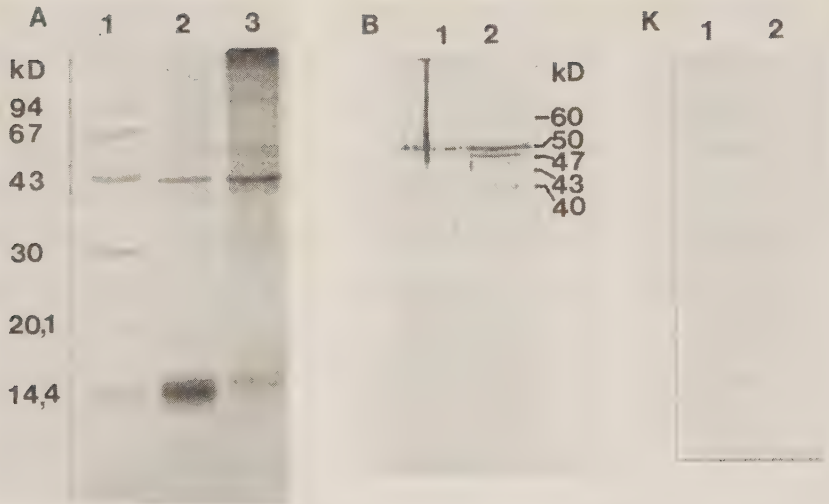


Abb. 12: Darstellung glomerulärer Proteine nach Aufschluß der Glomerula.

A) SDS-PAGE nach Coomassie-Blau Färbung. 1) Standard, 2) Überstand Ü1, 3) Pellet P1

B) Western-Immunoblot entwickelt mit dem Antikörper PM II 40 (20 µg/ml). 1) Überstand Ü1, 2) Pellet P1, K) Kontrolle

Sowohl im Überstand (Ü1) als auch im Pellet (P1) erkannte der Antikörper PM II 40 Antigen-tragende Proteine. Auffallend ist, daß Reaktionen mit dem Antikörper PM II 40 mit Proteinen des Überstandes nur unter nativen Bedingungen nachgewiesen wurden, während Proteine des Pellets nur unter teilweise denaturierenden Bedingungen mit dem Antikörper reagierten. Das 50 und 47 kD Protein ist im Western-Immunoblot nur mit den Pellet-Proteinen nachzuweisen. Diese Ergebnisse deuteten daraufhin, daß die Proteine des Pellets erst durch Detergenzbehandlung für den Antikörper zugänglich werden. Für den Nachweis von Antigenen im ELISA wurde das Pellet P1 daher in 8 M Urea aufgenommen, worauf sich das Pellet löste. Ein Großteil des Harnstoffs wurde durch Dialyse aus dem gewonnenen Über-

stand entfernt und ein Aliquot der Proteine im ELISA eingesetzt. Mit den nach Harnstoffbehandlung löslichen Proteinen des Pellets P1 reagierte der Antikörper PM II 40 nun auch im ELISA (Tab.10).

Ein Vergleich der mit dem Antikörper PM II 40 reagierenden Proteine des Pellets P1 mit den immunreaktiven Proteinen nach SDS-Extraktion isolierter Glomerula zeigt, daß die gleichen Proteine erkannt werden.

6.3.2. Gelchromatographische Auftrennung der löslichen Proteine nach Glomerulaaufschluß

Die löslichen Proteine des Glomerulaaufschlusses lassen sich nicht in einem Western-Immunoblot darstellen. Daher können die immunreaktiven Proteine den in der SDS-PAGE nach Coomassie-Blau-Färbung sichtbaren Proteinen nicht zugeordnet werden, und eine Angabe über den Molekulargewichtsbereich dieser Proteine kann über diese Methode nicht erfolgen. Als Alternative zur Ermittlung des Molekulargewichtsbereichs der reagierenden Proteine bietet sich eine Gelchromatographie an. Die löslichen Proteine aus dem Glomerulaaufschluß wurden mit Hilfe einer Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) an Superose 12 nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Fraktionen wurden im ELISA auf Proteine, die von dem Antikörper PM II 40 erkannt wurden, getestet (Abb.13).

Die beiden Hauptpeaks der ELISA-Fraktionen stimmen nicht mit dem Proteinhauptpeak überein, so daß eine spezifische Reaktion des IgM Antikörpers mit Proteinen aus den Fraktionen angenommen werden kann. Die Proteine in den am stärksten reagierenden Fraktionen liegen in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 280, 78 und 50,5 kD. Diese Fraktionen (22, 27 und

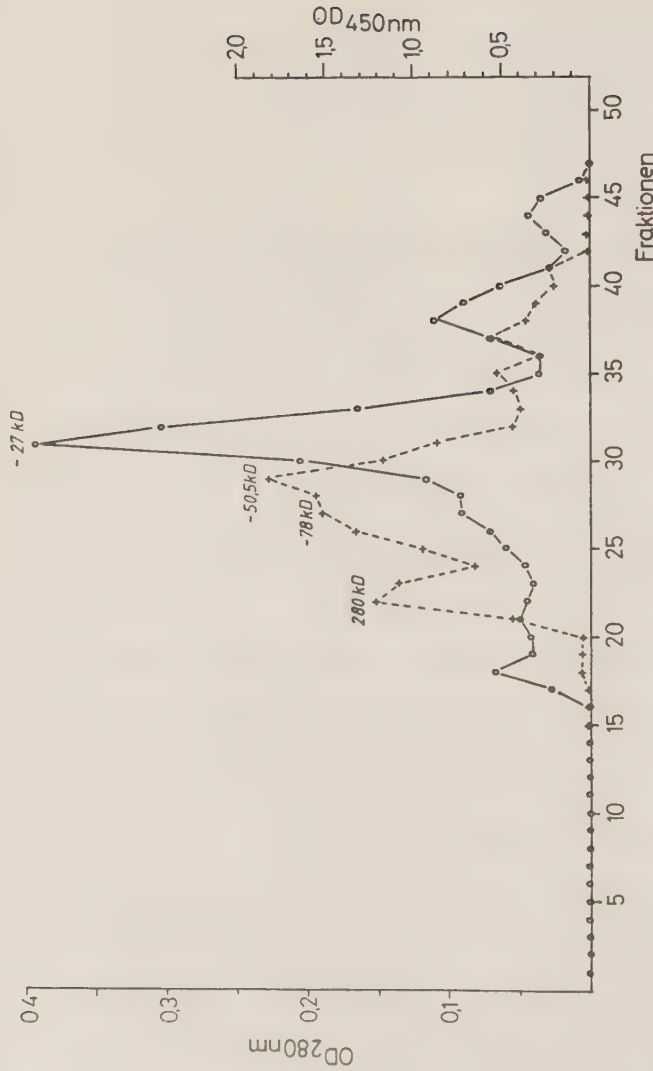


Abb. 13: Gelfiltration löslicher glomerulärer Proteine des Überstandes Ü1 nach Glomerulaufschluß mittels FPLC an Superose 12.

o-o Proteinkonzentration der Fraktionen gemessen als optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm

+--+ Reaktion der einzelnen Fraktionen mit dem Antikörper PM II 40 im ELISA. Die OD wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Antikörperkonzentration: 80 µg/ml, eingesetzte Proteinmenge: 10 µg/ml.

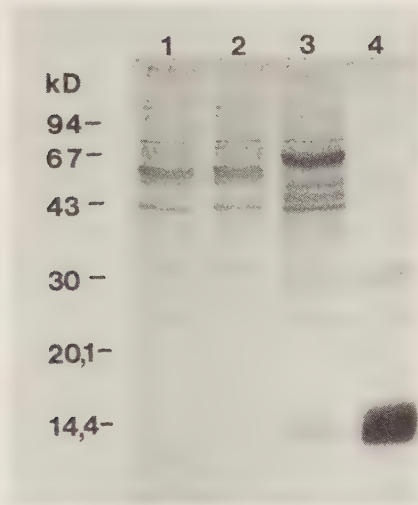


Abb. 14: SDS-PAGE von löslichen glomerulären Proteinen nach Gelchromatographie an Superose 12 nach Coomassie-Blau Färbung.

1) Fr. 22, 2) Fr. 27, 3) Fr. 29, 4) Fr. 32

29) sowie die Fraktion 32 wurden in einer SDS-PAGE untersucht (Abb.14).

In den Fraktionen 22 und 27 liegen offensichtlich die gleichen Proteine vor. Da die Fraktion 22 ein höheres Molekulargewicht aufweist als Fraktion 27, müssen in dieser Fraktion die Proteine als Polymere vorliegen. Die Fraktion 29 zeigt eine etwas andere Proteinzusammensetzung, die sich vor allem im Molekulargewichtsbereich von 43-67 kD von den übrigen Fraktionen unterscheidet. Fraktion 32, deren Proteine nicht mit dem Antikörper PM II 40 reagieren, enthält im wesentlichen Proteine ≤ 30 kD, was dem ermittelten Molekulargewicht aus der Gelchromatographie von schätzungsweise 27 kD entspricht.

6.4. Aminosäureanalyse glomerulärer, immunreaktiver Proteine

Die Molekulargewichte der immunreaktiven Proteine geben einen ersten Anhaltspunkt auf die Identität der Proteine. Die Frage stellte sich jedoch, ob die Heterogenität der mit PM II 40 reaktiven Proteine auf eine proteolytische Spaltung oder auf mehrere, voneinander unterschiedliche Proteine, die kreuzreagieren, zurückzuführen ist. Daher erschien die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der immunreaktiven Proteine sinnvoll, um eine eventuell vorhandene Verwandtschaft der immunreaktiven Proteine abzuschätzen. Für die Aminosäureanalyse wurden die unlöslichen Proteine des Pellets P1 eines Glomerulaaufschlusses gewählt. Diese konnten in einem Schritt durch SDS-PAGE aufgetrennt und isoliert werden. Die isolierten, in dem Molekulargewichtsbereich von 46-55 kD liegenden

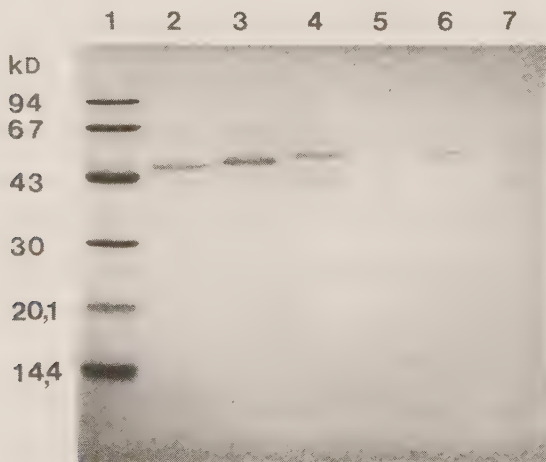


Abb. 15: Reinheitsüberprüfung der elektroeluierten glomerulären Proteine SDS-PAGE nach Coomassie-Blau Färbung.

1) Standard, 2) 46 kD, 3) 47 kD, 4) 49 kD, 5) 53 kD,
6) 50 kD, 7) 52 kD

Tab.11: Aminosäureanalyse der isolierten glomerulären Proteine

Proteine der humanen, renalen Glomerula*						
Aminosäure	46 kD	47 kD	49 kD	50 kD	52 kD	53 kD
Asp	88,2	99,3	124,0	77,0	60,7	80,5
Glu	71,5	98,4	106,0	101,6	102,0	113,0
Ser	80,6	83,2	93,8	93,4	108,0	92,4
Thr	71,7	76,2	77,9	73,6	71,6	77,9
Ala	133,2	124,6	117,9	89,6	82,8	84,0
His	9,8	9,2	11,6	29,3	29,3	29,6
Pro	130,3	125,0	112,2	86,2	82,1	98,1
Arg	78,3	84,1	80,5	84,7	87,1	84,8
Tyr	39,9	38,7	42,0	51,8	52,8	65,6
Val	67,4	56,7	52,9	62,4	59,7	58,7
Met	12,8	7,1	10,2	7,3	8,4	9,8
Ile	42,6	36,4	30,1	49,4	47,1	44,1
Leu	95,7	87,1	76,7	105,3	113,8	101,4
Phe	31,8	30,3	24,8	42,1	43,1	43,3
Lys	45,7	42,0	36,0	45,6	50,0	42,9

* = Anteil der jeweiligen Aminosäuren (in pmol) bezogen auf 1000 pmol Gesamt-Aminosäuren

Die Werte der Aminosäureanalyse stammen aus Doppelbestimmungen

Proteine des Pellets P1 wurden in einer SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft (Abb.15). Die Immunreaktivität der isolierten Proteine wurde in einem Western-Immunoblot mit dem Antikörper PM II 40 getestet. Die immunreaktiven Proteine wurden in einer PTC-Aminosäureanalyse zur Ermittlung ihrer Aminosäurezusammensetzung eingesetzt. (Tab.11).

Die Aminosäurezusammensetzung der Proteine ändert sich, allerdings nicht sprunghaft, wie es bei Proteinen, die in keiner Beziehung zueinander stehen, vorkommt, sondern kontinuierlich innerhalb der im Molekulargewicht aufeinanderfolgenden Proteine. Die Proteine mit dem Molekulargewicht 46-49 kD und die mit dem Molekulargewicht von 50-53 kD scheinen direkt voneinander abzustammen. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß

die Heterogenität der immunreaktiven Proteine auf proteolytischen Abbau zurückzuführen ist.

7. Darstellung der Antigene glomerulärer Zellen aus Zellkulturen

Der Glomerulaaufschluß konnte die Frage nach der Lokalisation der immunreaktiven Antigene in den glomerulären Zellen nicht klären. Zum einen wurden Antigene in der löslichen Cytoplasmaproteinfraktion gefunden, zum anderen konnten antigentragende Proteine in der Pelletfraktion P1 nach Glomerulaaufschluß nachgewiesen werden, die neben unlöslichen Proteinen auch Membranvesikel enthielt. Die flächige Immunfluoreszenz der Zellen der isolierten Glomerula nach Behandlung mit dem Antikörper PM II 40, entsprach mehr einer cytoplasmatischen Lokalisation, als einer Membranassoziierten (III.6.1. Abb.10). Letzte Gewißheit sollten Immunfluoreszenztests mit glomerulären Zellen aus Zellkulturen bringen.

Ausgewachsene Zellen isolierter Humanglomerula wurden auf ihre Zellzugehörigkeit getestet. Der Antikörper PM II 40 wurden nach kurzer Methanolfixierung der Zellen im Immunfluoreszenztest mit Podozyten- und Mesangiumzellen eingesetzt. Der Antikörper PM II 40 reagierte eindeutig mit Cytoskelett der Podozyten (Abb.16).

8. Reaktion der monoklonalen Antikörper mit den intermediären Filamenten Vimentin und Desmin

Die Immunfluoreszenz zeigte, daß der Antikörper PM II 40 mit Cytoskelett von Podozytenzellen reagierte (III.7. Abb.16). Nach Lage der sichtbaren

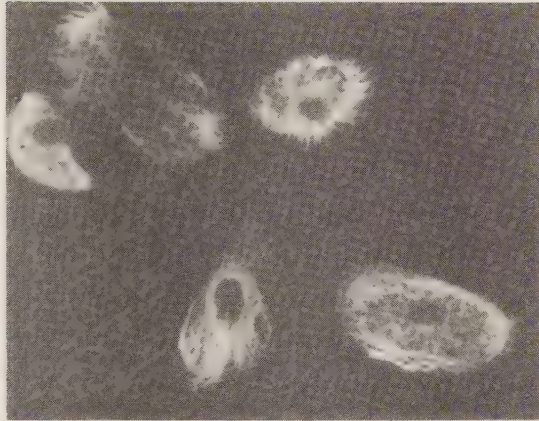


Abb. 16: Reaktion des Antikörpers PM II 40 mit in Kultur gewachsenen Podozytenzellen im indirekten Immunfluoreszenztest. x 740

Filamente kann es sich nicht um Aktin handeln, da Aktinfilamente eine höhere Ausrichtungsordnung zeigen. Die Vermutung lag nahe, daß es sich hierbei um intermediäre Filamente handeln könnte. Als intermediäre Filamente in Podozyten kommen nur Vimentin und Desmin in Betracht (Bachmann et al., 1983). Cytokeratine, wie andere Epithelzellen, besitzt dieser Zelltyp nicht, obwohl es sich um das viscereale Deckepithel der Glomerula handelt.

Die Reaktion der Antikörper PM II 40, PM II 62 und Hyp II 120 mit Vimentin und Desmin wurde in einem Western-Immunoblot überprüft (Abb. 17). Die Antikörper PM II 40 und Hyp II 120 reagierten sowohl mit Vimentin als auch mit Desmin, während der Antikörper PM II 62 mit Vimentin jedoch kaum mit Desmin reagierte. Der Kontroll-Antikörper α -Vimentin reagierte nur

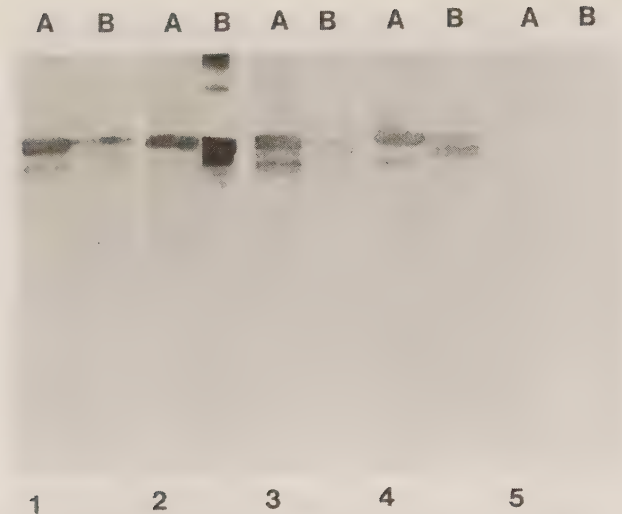


Abb. 17: Western-Immunoblot mit Vimentin und Desmin.

Entwickelt mit den Antikörpern: 1) α -Vimentin, 2) PM II 40, 3) PM II 62, 4) Hyp II 120, 5) Antikörper-Enzymkonjugat-Kontrolle.

A) Rinder-Vimentin, B) Huhn-Desmin

mit Vimentin. Diese Ergebnisse zeigen, daß als glomeruläre Antigene Vimentin und/oder Desmin in Betracht kommen. Inhibitionsversuche mit diesen Proteinen konnten nicht durchgeführt werden, da sie in einem Puffer mit 6 M Harnstoff gelöst waren, der alleine die Antikörperreaktionen im starken Maße beeinträchtigte. Bei stärkerer Verdünnung des Puffers schienen die Proteine auszufallen (eigene Daten).

9. Untersuchungen an Streptokokkenstämmen von Patienten mit APGN oder "einfacher" Streptokokkeninfektion und den jeweils zugehörigen Patientenseren

Die Möglichkeit einer Autoimmunreaktion, ähnlich der Antikörperreaktion des PM II 40, sollte mit Hilfe von Patientenseren, die von an APGN erkrankten Patienten stammen, und den zugehörigen, infektiösen Streptokokkenstämmen untersucht werden.

Tab.12: Streptokokkenstämmen von Patienten mit und ohne entwickelter akuten Poststreptokokken-Glomerulonephritis

Isolate					
Seriennummer	Labornr.	Haut	Rachen	Gruppe	APGN
MDRS 88014	TT 14	-	+	C	-
MDRS 88015	TT 15	+	-	A	-
MDRS 88016	TT 16	+	-	A	-
RPS 88017	TT 17	+	-	G	-
2295700	APGN 1	+	+	A	+
2333400	APGN 19	+	+	G	+
2337600	APGN 22	+	+	G	+
2338400	APGN 23	+	+	G	+
2338500	APGN 24	+	+	G	+
2297000	APGN 27	+	-	G	-
2334900	APGN 31	+	+	G	+
2228900	APGN 33	+	+	G	+
2331000	APGN 35	+	-	A	+
2339200	APGN 37	+	-	A	+
2339400	APGN 38	+	+	A	+
2337900	APGN 39	+	-	A	+
2327900	APGN 40	+	-	A	+
2329400	APGN 41	+	-	A	+
2275001	APGN 43	+	+	A	+
2324000	APGN 44	+	+	A	+

Die Seren und Streptokokkenstämme stammen von Schulkindern aus einem Epidemiegebiet auf Trinidad, die Haut- und/oder Racheninfektionen aufwiesen. Die Gruppenantigene der isolierten Stämme wurden mit Hilfe des Strep-Api-Systems und Agglutination mit gruppenspezifischen Antikörpern bestimmt. In der Tabelle 12 sind die verwendeten Stämme aufgeführt.

9.1. Reaktion der Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteine ausgesuchter Patientenstämme mit den entsprechenden Patientenseren

Sollten Antikörperkreuzreaktionen eine Rolle in der Pathogenese der akuten Poststreptokokken-Glomerulonephritis spielen, so müßten sich Antikörper sowohl gegen Streptokokkenantigene als auch gegen Glomerula in den Patientenseren finden.

Es wurden Seren von Patienten, die an APGN erkrankten, auf Antikörper untersucht, die mit Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen der von den Patienten isolierten Streptokokkenstämme reagieren (Abb.18, 19a). Als Kontrollen wurden Seren, die von Streptokokken-infizierten Patienten ohne Nacherkrankung stammen, und ein Serumpool von gesunden Personen eingesetzt. Mit diesen Kontrollen wurden Reaktionen ausgeschlossen, die auf Bindung des Fc-Teils von Antikörpern und auf Antikörper beruhen, die normalerweise bei jeder Streptokokkeninfektion auftreten.

Von fünf Stämmen, die von Patienten mit APGN stammen, reagierten vier mit den entsprechenden Seren dieser Patienten mit einem um einer Zehner-Potenz höheren Antikörper-Titer als mit dem Normalserum-Pool, während die drei von nicht an APGN erkrankten Patienten isolierten Stämme mit dem Antikörpertiter der entsprechenden Seren unter dem Antikörpertiter des

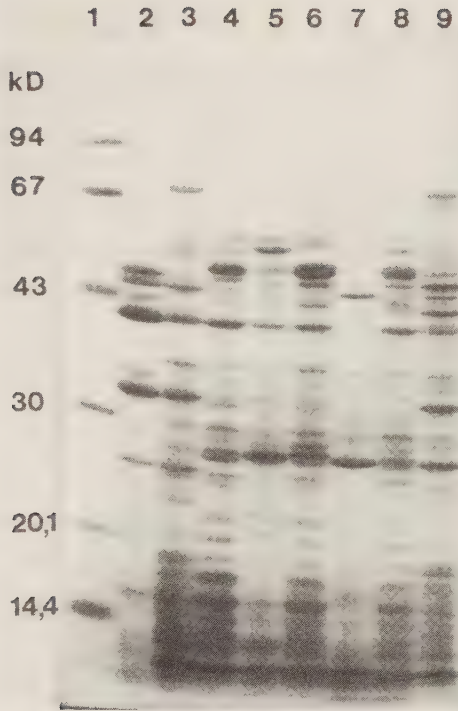


Abb. 18: SDS-PAGE von Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen von isolierten Patientenstämmen nach Coomassie-Blau Färbung.

1) Standard, 2) APGN 24, 3) APGN 31, 4) APGN 38, 5) APGN 40, 6) APGN 44, 7) TT 14, 8) TT 15, 9) TT 17

Normalserum-Pools blieben.

1986 veröffentlichte Benslimane et al. ein ähnliches Ergebnis der Antikörpertiter gegen Polysaccharide der Streptokokken der Gruppe A in Patienten mit und ohne APGN. In den verwendeten Oberflächenprotein-Präparationen befinden sich auch Carbohydrate, so daß sich die Frage stellte, ob nur Antikörper gegen Carbohydrate im ELISA erfaßt wurden. Daher wurden die Oberflächenprotein-Präparationen mit Trypsin behandelt, um vorhandenes Protein zu zerstören, und parallel mit unbehandeltem Ober-

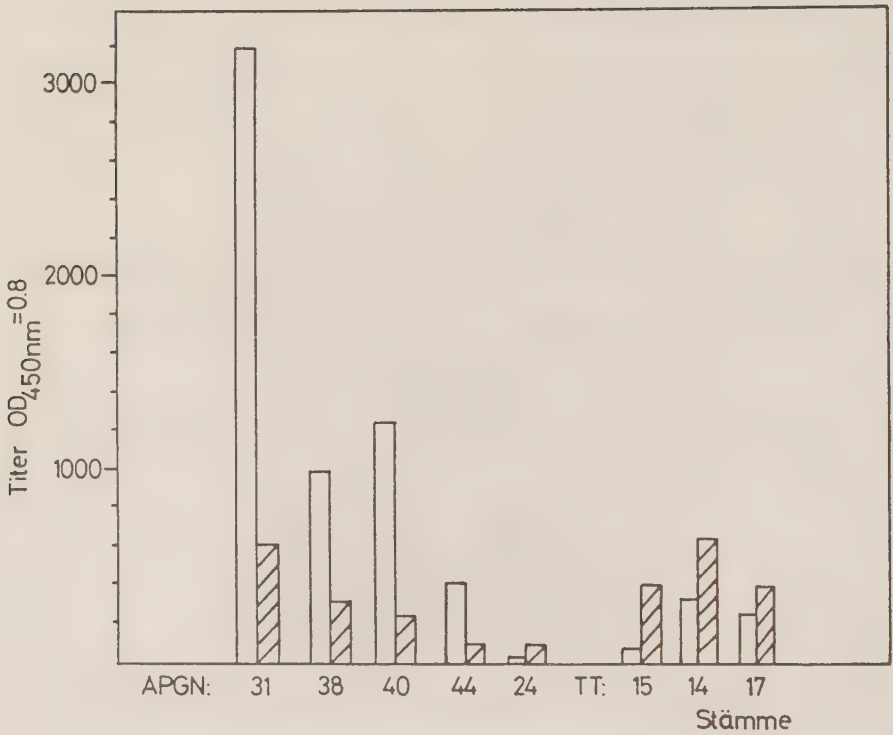


Abb. 19a: ELISA mit Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen von Streptokokkenstämmen, isoliert von Patienten mit (APGN) und ohne (TT) akute Poststreptokokkenglomerulonephritis, und den homologen Patientenseren.



zum Stamm homologes Patientenserum



Normalserum-Pool

Aufgetragen ist der Antikörpertiter bei einer OD von 0,8 mit einer Wellenlänge von 450 nm.

flächenprotein im ELISA eingesetzt. Der Wert nach Abzug der Werte für Trypsin-behandelte von den unbehandelten Oberflächenproteinen gibt an, ob Antikörper in den getesteten Humansenen existieren, die mit Trypsin-sensitiven Oberflächenproteinen reagieren (Abb.19b). Hiernach ergibt sich ein etwas anderes Bild. Vor allem von APGN-Stämmen der Gruppe A reagierten Trypsin-sensitive Oberflächenproteine mit Antikörpern aus den homologen Seren im stärkeren Maß als mit normalem Humanserum. Antikörper aus Seren von Patienten mit APGN nach einer Gruppe G-Streptokokkeninfektion gegen Trypsin-sensitive Proteine lagen nicht über denen im Normalserum. Dies galt auch für Seren von Patienten ohne Nacherkrankung mit Ausnahme des zum Stamm TT 17 homologen Serums. Zusätzlich konnte für das zum Gruppe A-Stamm APGN 40 homologe Antiserum in einem Opsonophagozytose-Test gezeigt werden, daß opsonogene Antikörper vorhanden waren (eigene Daten).

9.2. Reaktion von Patientenserum mit SDS-extrahierten Proteinen aus isolierten Glomerula

Es zeigte sich im vorangegangenen Versuch, daß Patienten, die eine APGN entwickelten, einen im Vergleich zu den Kontrollen hohen Antikörpertiter gegen Streptokokken-Oberflächenproteine besitzen. Die Frage stellte sich, ob sich auch Antikörper gegen glomeruläre Antigene in den Patientenserum nachweisen lassen.

Da eine Beurteilung von vergleichenden Immunfluoreszenztests an Nierenschnitten und isolierten Glomerula mit Patientenserum und Normalserum nicht möglich war, wurde die Darstellung von kreuzreaktiven Proteinen der Glomerula mit Patientenserum in einem Western-Immunoblot vorgezogen (Abb.20).

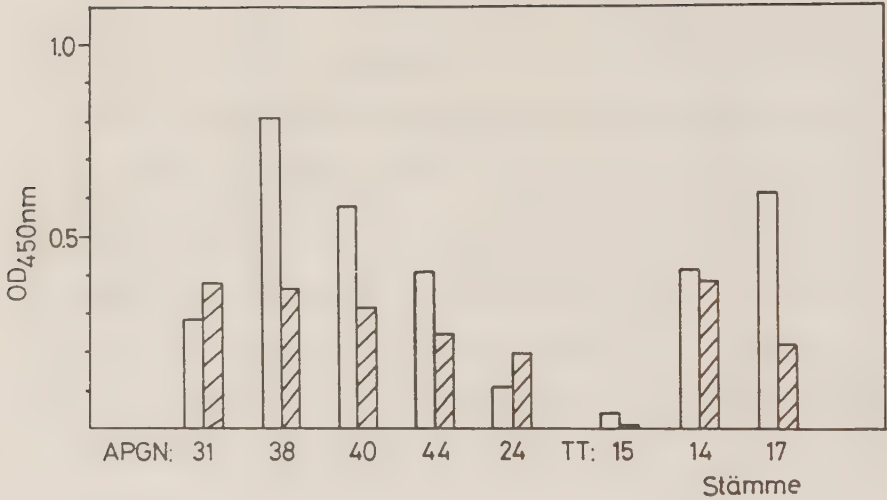
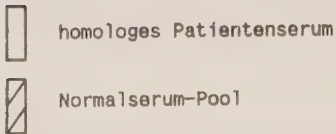


Abb. 19b: ELISA mit Mutanolysin-extrahierten, Trypsin-behandelten Oberflächenproteine.

Aufgetragen ist die Differenz in der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm von unbehandelten und Trypsin-behandelten Oberflächenproteinen mit den jeweils homologen Patientenseren.



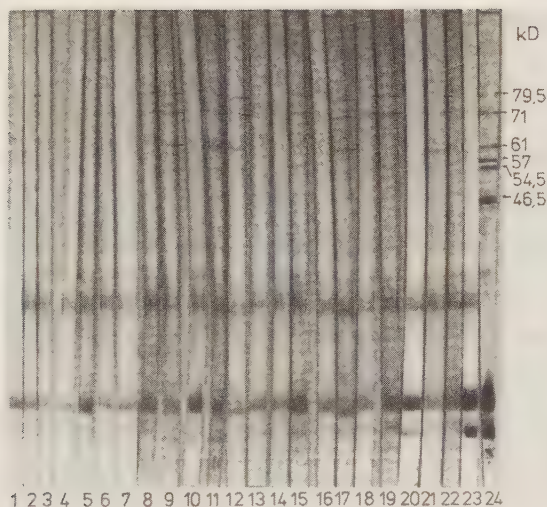


Abb. 20: Western-Immunoblot mit SDS-extrahierten Glomerulaproteinen und Patientenserum.

Seren von Patienten ohne entwickelte APGN: 1) TT 14, 2) TT 17, 3) TT 15, 4) TT16

Seren von Patienten mit APGN: 5) APGN 1, 6) APGN 19, 7) APGN 22, 8) APGN 23, 9) APGN 24, 10) APGN 27, 11) APGN 31, 12) APGN 33, 13) APGN 35, 14) APGN 40, 15) APGN 26, 16) APGN 37, 17) APGN 38, 18) APGN 39, 19) APGN 41, 20) APGN 43, 21) APGN 44,

22) Normalserum-Pool, 23) nur α-human Ig-POD markiert, 24) PM II 40 (20 µg/ml)

Alle Seren wurden 1:100 verdünnt

Im Gegensatz zu den Seren von Patienten ohne Nacherkrankung, von denen zwei mit je einem glomerulären Protein reagierten, reagierten die Seren von an APGN erkrankten Patienten mit mehreren Proteinen, vor allem mit denen, die in einem Molekulargewichtsbereich von 79,5 und 71 kD lagen. In 65% der getesteten Seren von Patienten, die an APGN erkrankten, ließen sich Antikörper gegen glomeruläre Proteine nachweisen.

9.3. Reaktion der Patientenseren mit den intermediären Filamenten Vimentin und Desmin

Nachdem für die monoklonalen Antikörper als vermutliche glomeruläre Antigene Vimentin und/oder Desmin identifiziert werden konnten, wurden die Patientenseren ebenfalls auf ihre Reaktivität gegenüber diesen Antigenen im Western-Immunoblot überprüft (Abb.21a,b). Antikörper gegen Desmin konnten in allen Seren, auch im Normalserum, gefunden werden; Antikörper gegen Vimentin fanden sich vor allem in den homologen Patientenseren zu den Stämmen APGN 38, APGN 40, TT 15 und TT 17. Antikörper aus dem Normalserum-Pool reagierten nicht mit Vimentin.

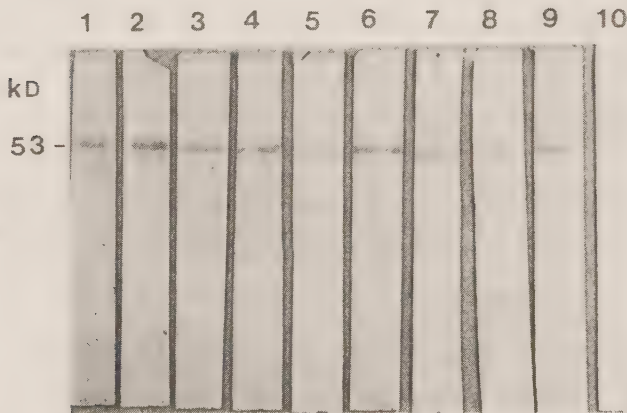


Abb. 21a: Western-Immunoblot mit Desmin.

Entwickelt mit den Seren: 1) sAPGN 31, 2) sAPGN 24, 3) sAPGN 38, 4) sAPGN 40, 5) sAPGN 44, 6) sTT 14, 7) sTT 15, 8) sTT 17, 9) Humanserum-Pool, 10) Antikörper-Enzymkonjugat-Kontrolle. Alle Seren wurden 1:75 verdünnt.

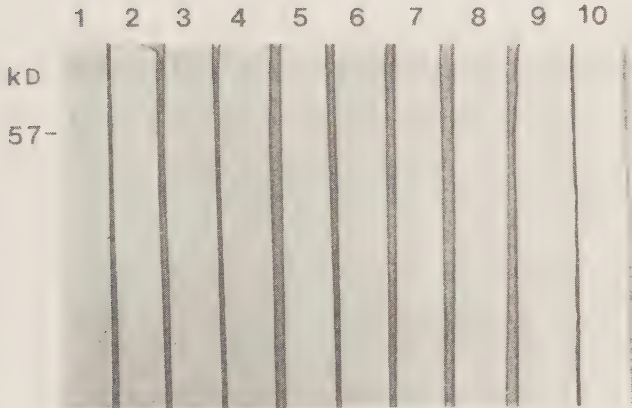


Abb. 21b: Western-Immunoblot mit Vimentin.

Entwickelt mit den Seren: 1) SAPGN 31, 2) SAPGN 24, 3) SAPGN 38, 4) SAPGN 40, 5) SAPGN 44, 6) sTT 14, 7) sTT 15, 8) sTT 17, 9) Humanserum-Pool, 10) Antikörper-Enzymkonjugat-Kontrolle. Alle Seren wurden 1:75 verdünnt.

IV. Diskussion

Die Pathogenese der akuten Poststreptokokken-Glomerulonephritis ist nach wie vor ein wissenschaftliches Problem. Wie in der Einleitung erwähnt, existieren verschiedene Hypothesen, die, kurz zusammengefaßt, für die Pathogenese der APGN die Ausbildung von Immunkomplexen, Beteiligung von Kreuzreaktionen oder eine enzymatische Schädigung des Gewebes in Betracht ziehen.

In dieser Untersuchung sollte die Möglichkeit von Kreuzreaktionen überprüft werden. Es konnten Kreuzreaktionen von monoklonalen Mausantikörpern, die gegen menschliches Nierengewebe gerichtet sind, mit Streptokokken der Gruppe A nachgewiesen werden. Die antigenen Determinanten der Streptokokken und die der Niere wurden eingehend untersucht. Die dabei auftretenden Fragen werden im einzelnen diskutiert.

1. Spezifität der monoklonalen Antikörper

1.1. Fc-Rezeptoren der Streptokokken

In der Einleitung wurde erwähnt, daß Streptokokken Proteine besitzen, die den Fc-Teil von Immunglobulinen binden können (I.4.2.). Daher muß die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung der Antikörper durch den Fc-Rezeptor der Streptokokken bei Untersuchungen mit Antikörpern oder Antisera gegen Streptokokken berücksichtigt werden. Diese Fc-Rezeptoren wurden nicht nur auf Gruppe A Streptokokken sondern auch auf Gruppe C und G Streptokokken vor allem für Kaninchen- und Human-Immunglobulinen der Klasse G nachgewiesen (Christensen et al., 1979a; Grubb et al., 1982;

Kronvall, 1973; Schalén et al., 1978; Schalén et al., 1980; Wagner et al., 1983). In einigen Untersuchungen zeigte Maus-IgG keine Fc-Rezeptor-Spezifität oder wurde wesentlich schlechter gebunden (Björck und Kronvall, 1984; Kronvall, 1973), in anderen hingegen wurde eine Fc-Rezeptor-Bindung von Maus IgG nachgewiesen (Schalén et al., 1981; Wagner et al., 1983). Human IgM konnte von den getesteten Stämmen nicht gebunden werden (Björck und Kronvall, 1984; Grubb et al., 1982; Kronvall, 1973). Für Maus IgM liegen keine derartigen Untersuchungen vor. Allerdings wurde für den bekanntesten bakteriellen Fc-Rezeptor, das Protein A von *Staphylococcus aureus*, gezeigt, daß Protein A Maus-IgM nicht binden kann, im Gegensatz zu IgM anderer Spezies (Ey et al., 1978). Daher ist es unwahrscheinlich, daß Fc-Rezeptor Bindungen eine Rolle bei den verwendeten monoklonalen Maus-IgM-Antikörpern und deren Bindung an Streptokokken spielen, insbesondere, da sich im Dot-Blot-Test (III.1.2.) bei einigen Stämmen unterschiedliche Reaktionen mit den einzelnen Antikörpern ergaben, die nicht hätten auftreten dürfen, wenn es sich um eine IgM-Fc-Rezeptor-Bindung handeln würde. Auch die unterschiedlichen Reaktionen der Antikörper mit Pepsin-extrahierten Streptokokken-Oberflächenproteinen sprechen dagegen, daß die beobachteten Kreuzreaktionen auf Fc-Rezeptorbindung zurückzuführen sind (III.4.1.)

1.2. Gewebsspezifität der monoklonalen Antikörper

Die Gewebsspezifität der einzelnen Antikörper fiel unterschiedlich aus (III.1.1.), so daß angenommen werden kann, daß die Antikörper unterschiedliche Epitope auf humanen Gewebe erkennen.

Im indirekten Immunfluoreszenztest zeigten die monoklonalen Antikörper

mit renalen Glomerula ein granuläres Immunfluoreszenz-Muster, an dem sehr wahrscheinlich mesangiale als auch epitheliale Zellen beteiligt sind (III.1.1.). Die Beteiligung von Antigenen, die auf oder in Podozyten gelegen sind, an Reaktionen mit dem Antikörper PM II 40 wurden durch Immunogold-Elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen (Goroncy-Bermes, 1987). Ebenso reagierte der Antikörper mit in Kultur-gehaltenen, renalen Podozytenzellen (III.7.) und Mesangiumzellen (Haensch, Schönermark, persönliche Mitteilung). Da die beiden anderen Antikörper PM II 62 und Hyp II 120 ein ähnliches Immunfluoreszenzmuster mit den Glomerula zeigen, sind an diesen Antikörperreaktionen sehr wahrscheinlich ebenfalls beide Zelltypen beteiligt.

2. Identifizierung kreuzreaktiver Determinanten auf dem M-Protein der Gruppe A Streptokokken

2.1. Identifizierung der kreuzreaktiven Determinanten auf dem M-Protein

Die Methodenauswahl bei der Identifizierung kreuzreaktiver Determinanten kann für den Nachweis von Antikörperreaktionen entscheidend sein. Die Interpretation von Untersuchungsergebnissen, die durch Methoden, die eine Denaturierung der antigenen Determinante zur Folge haben, gewonnen wurden, sind nicht eindeutig interpretierbar. Die Veränderung der Determinante durch eine Denaturierung kann zu einem Verlust der Antikörpererkennung führen, so daß mit denaturierenden Methoden gewonnene, negative Ergebnisse nicht absolut zu sehen sind. Erst eine Untersuchung mit nativen Antigenen gibt genauer Auskunft über die Antikörperreaktivität. Je nach Antikörper können native oder denaturierte Antigene besser erkannt

werden. So werden Antikörper, deren Epitope durch aufeinanderfolgende Aminosäuren gebildet werden, das denaturierte Antigen besser erkennen, während Antikörper, deren Epitope durch eine bestimmte Konformation gebildet werden, unter denaturierenden Bedingungen stark veränderte Epitope nicht mehr erkennen können (Burnette, 1981; Reynolds und Tanford, 1970).

Die kreuzreaktiven Determinanten der Gruppe A Streptokokken konnten auf dem M-Protein durch entsprechende Hinweise aus:

A) Opsonophagozytose-Tests und Inhibierung der Antikörper mit einem gereinigten M-Protein-Peptid, B) Western-Immunoblots mit Streptokokken-Oberflächenproteinen und C) Aminosäuresequenzanalyse eines immunreaktiven Peptids lokalisiert werden.

Die monoklonalen Antikörper reagierten im Dot-Blot (III.1.2.) mit einer Reihe von Streptokokken der Gruppe A. Durch den Vergleich der Kreuzreaktionen der drei monoklonalen Antikörper sollte untersucht werden, ob alle der getesteten Antikörper mit M-Protein reagieren, und, wenn ja, ob die gleiche Determinante auf dem M-Protein erkannt wird.

A) Opsonophagozytosetests und Inhibierung der Antikörper mit einem gereinigten M-Protein-Peptid

Erste Hinweise auf die Beteiligung von M-Protein an einer Antikörperreaktion gibt ein Opsonophagozytose-Test; denn opsonisierende Antikörper gegen Streptokokken der Gruppe A sind hauptsächlich gegen M-Protein gerichtet (Fischetti, 1983; Lancefield, 1962). Bei diesem Test ist zu beachten, daß nur protektive antigene Determinanten des M-Proteins, nicht jedoch nicht-protektive Determinanten nachgewiesen werden. Die Antikörper PM II 40 und PM II 62 opsonisierten Stämme der M-Typen 1, 6 und 12, sowie der Antikörper PM II 40 noch zusätzlich einen Stamm vom M-Typ 4. Diese

beiden Antikörper erkennen nach Definition von Lancefield (1962) protektive Determinanten, die auf dem M-Protein lokalisiert sind. Abgesichert wird dieser Befund durch die Inhibition der Reaktionen dieser Antikörper durch ein hochgereinigtes Pepsinspaltprodukt des M-Proteins vom M-Typ 6 (III.4.1.1.).

Der Antikörper Hyp II 120 unterscheidet sich von den beiden übrigen Antikörpern im Opsonophagozytose-Test; denn dieser Antikörper erkannte keine protektiven Determinanten der getesteten Stämme. Dieses Ergebnis läßt zwei Interpretationen zu:

- 1.) Der Antikörper reagiert mit einem anderen Protein als dem M-Protein, z.B. T- oder R-Antigen,
- 2.) Der Antikörper reagiert mit einer nichtprotektiven Determinante des M-Proteins.

T- und R-Antigene der Streptokokken der Gruppe A sind im Gegensatz zu M-Protein sehr resistent gegen eine Trypsinbehandlung (Lancefield und Dole, 1946; Lancefield, 1958; Pakula, 1951). Daher werden T- und R-Antigene von M-Protein tragenden Streptokokken gewonnen, indem das M-Protein durch Trypsin abgedaut wird und die R- und T-Antigene durch z.B. Säureextraktion isoliert werden.

Die Trypsin-Resistenz der mit dem Antikörper Hyp II 120 reagierenden, antigenen Determinanten wurde überprüft. Nach einer Stunde Trypsinverdauung ganzer Streptokokkenzellen verringerte sich die Antikörperreaktion mit den so behandelten Streptokokken um 72% (eigene Daten). Die antigene Determinante des Antikörpers Hyp II 120 ist demnach Trypsin-sensitiv. Dies deutet auf M-Protein als Träger des Epitops hin.

B) Western-Immunoblot

Im Western-Immunoblot mit Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen reagierten alle drei Antikörper mit den gleichen Proteinen. Fischetti et al. (1985) beschrieb Größenvariabilitäten von Lysin-extrahierten M-Proteinen verschiedener Stämme mit unterschiedlichen M-Typen in einem Bereich von 41-80 kD. Für verschiedene M-Typ 6 Stämme wurden unterschiedliche Molekulargewichte des M-Proteins bestimmt, die von 53-64 kD variierten. In dieser Untersuchung unterstützen die Molekulargewichte der mit den monoklonalen Antikörper reagierenden Proteine als auch deren Reaktion mit M-Protein typenspezifischen Serum (III.2.3.) die Annahme, daß M-Protein das kreuzreaktive Antigen der drei Antikörper ist.

C) Aminosäuresequenzanalyse

Für den Antikörper PM II 40 bewies indirekt schon Goroncy-Bermes (1987), daß er mit M-Protein kreuzreagiert. Durch die Aminosäuresequenzierung eines durch Pepsinspaltung eines M-Typ 1 Proteins gewonnenen Peptids, das mit dem Antikörper PM II 40 kreuzreagierte, konnte eindeutig bewiesen werden, daß dieser Antikörper tatsächlich mit M-Protein reagiert, da die ersten zwanzig Aminosäuren des aminoterminalen-Teils dieses Peptids vollständig identisch sind mit denen in der Literatur angegebenen Anfangssequenzen des pep M1-Peptids (III.5.2., Kraus et al., 1987; Movárec et al., 1986).

Rückschließend ist damit auch bewiesen, daß es sich bei den mit dem Antikörper PM II 40 reagierenden, Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen um M-Protein handelt. Da diese Oberflächenproteine auch mit den beiden anderen Antikörpern reagierten, erkennen unter Berücksichtigung der gerade beschriebenen Ergebnisse die Antikörper Hyp II 120 und

PM II 62 ebenfalls antigene Determinanten auf dem M-Protein.

2.2. Lokalisation der antigenen Determinanten auf dem M-Protein

Nachdem M-Protein als kreuzreaktives Antigen der drei Antikörper identifiziert werden konnte, erschien es interessant, die antigenen Determinanten auf dem M-Protein zu lokalisieren, um zu sehen, ob die Antikörper die gleichen oder unterschiedliche Epitope erkennen. Jones et al. (1985) beschrieb die Lokalisation von variablen und konservierten Epitopen auf M-Protein von Gruppe A Streptokokken mit Hilfe von Pepsinspaltung des M-Proteins. Durch limitierte Pepsinspaltung bei einem pH-Wert von 5,8 wird das M-Protein bevorzugt etwa in der Mitte gespalten (I.3.1. Abb.2). Ein Vergleich der Antikörperreaktionen der monoklonalen Antikörper mit pep M-Protein und vollständig erhaltendem M-Protein (M-Protein ganzer Streptokokkenzellen, cloniertes M-Protein) bzw. dem an Streptokokkenzellen verbliebenen carboxyterminalen Teil des M-Proteins nach Pepsinspaltung, führte dazu, daß die Epitope der monoklonalen Antikörper entweder auf dem amino- oder carboxyterminalen Teil des M-Proteins lokalisiert werden konnten (Jones et al., 1985). In ähnlicher Weise wurde die Lokalisation der Epitope der in diesen Untersuchungen verwendeten monoklonalen Antikörper vorgenommen.

Die antigene Determinante, die der Antikörper Hyp II 120 erkennt, scheint von der Pepsinbehandlung kaum beeinflußt zu werden. Im ELISA mit Pepsin-behandelten Streptokokken verlor der Antikörper Hyp II 120 kaum seine Bindungsaktivität. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis reagierte der Antikörper mit keinen der Pepsin-extrahierten Proteine im ELISA

(III.4.1.1.). Deshalb muß geschlossen werden, daß die antigene Determinante auf dem am Bakterium verbliebenen carboxyterminalen Teil des M-Proteins liegt.

Der Antikörper PM II 62 verlor insbesondere bei den Stämmen M1 R86/436 und M6 Ref an Bindungsaktivität bei Pepsin-behandelten Streptokokken. Er erkannte Pepsin-extrahierte Peptide dieser Stämme im ELISA, so daß anzunehmen ist, daß die Epitope auf der aminoterminalen Hälfte des M-Proteins der Stämme M1 R86/436 und M6 Ref lokalisiert sind. Der geringe Reaktionsverlust des Antikörpers PM II 62 mit den Pepsin-behandelten Stämmen M1 Ref und M6 BL und die eindeutige Reaktion des Antikörpers mit Pepsin-extrahierten Proteinen im ELISA lassen vermuten, daß es eventuell mehrere Epitope für den Antikörper PM II 62 auf diesen M-Proteinen gibt, die sowohl auf der aminoterminalen Hälfte des M-Proteins (Erkennen von Pepsin-extrahierten Proteinen) als auch auf der carboxyterminalen Hälfte des M-Proteins (kaum Verlust an Bindung bei Pepsin-behandelten Streptokokken) lokalisiert sind.

Der Antikörper PM II 40 reagierte nur schwach mit den Pepsin-behandelten M1- und M6 Ref-Stämmen im Ganzzell-ELISA. Er reagierte hervorragend mit den Pepsin-extrahierten Peptiden der M1-Stämme, jedoch kaum mit denen des M6 Ref-Stammes. Die antigenen Determinanten des Antikörpers PM II 40 scheinen deshalb auf dem aminoterminalen Teil des M-Proteins der M1-Stämme zu liegen. Im Falle des Stammes M6 Ref kann jedoch weder auf der carboxyterminalen noch auf der aminoterminalen Hälfte des M-Proteins der Antikörper PM II 40 seine entsprechenden Epitope finden. Die Spaltung des M-Proteins scheint das Epitop zerstört bzw. gestört zu haben, wobei die Pepsinspaltstelle nicht innerhalb dieses Epitops liegen muß. Auch eine Veränderung der Umgebung der Epitope kann einen Verlust der Antigenität

durch Koformationsänderungen (auch Ladungsverschiebungen, sterische Effekte von Seitenketten) zur Folge haben (Atassi, 1984). Die antigenen Determinanten des M6 BL-Stammes scheinen für den Antikörper PM II 40 zum größten Teil auf der carboxyterminalen Hälfte des M-Proteins lokalisiert zu sein.

Eine zusammenfassende Darstellung der möglichen Lokalisationen der Epitope der Antikörper auf M-Protein der verschiedenen Stämme zeigt Abbildung 1.

Der aminoterminal Teil des M-Proteins enthält neben nichtprotektiven Determinanten, die Determinanten, die für die Bindung typenspezifischer, opsonogener Antikörper verantwortlich sind (Jones und Fischetti, 1988), während der carboxyterminale Teil zwar immunogene, aber nicht-protektive Determinanten trägt, die von nicht-opsonogenen Antikörpern erkannt werden (Fischetti und Windels, 1988; Jones et al., 1985). Diese Befunde bestätigen die Lokalisation der antigenen Determinanten auf dem M-Protein, die mit den monoklonalen Antikörpern reagieren. Der nicht-opsonogene Antikörper Hyp II 120 erkannte ein Epitop auf der carboxyterminalen Hälfte des M-Proteins, während die beiden opsonogenen Antikörper PM II 40 und PM II 62 mit antigenen Determinanten auf dem aminoterminalen Teil des M-Proteins reagierten.

2.3. Unterschiede im Opsonisierungsverhalten der monoklonalen Antikörper gegenüber Streptokokkenstämmen des gleichen M-Typs

Im Opsonophagozytose-Test (III.2.1.) zeigten Streptokokkenstämmen gleichen M-Typs (M1 Ref/ M1 R86/436; M6 Ref/ M6 BL) ein unterschiedliches

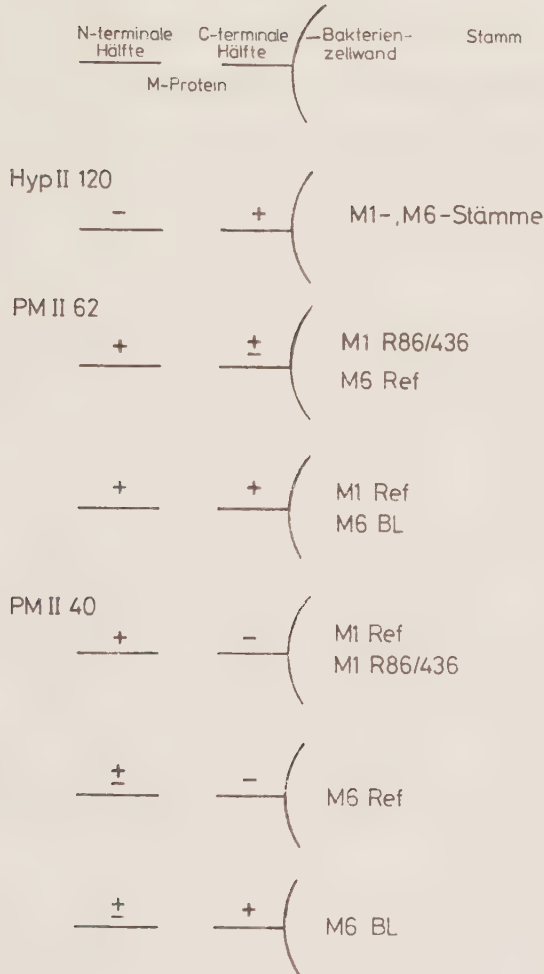


Abb.1.: Lokalisation der antigenen Determinanten, die mit den mono-
klonalen Antikörpern reagieren, auf dem M-Protein der verschie-
denen Stämme.

- + Epitop vorhanden
- kein Epitop nachweisbar

Opsonisierungs-Verhalten mit den Antikörpern PM II 40 und PM II 62. Die Stämme M1 R86/436 und M6 BL wurden durch die Antikörper opsonisiert, während die Stämme M1 Ref und M6 Ref nicht opsonisiert wurden, obwohl beide Antikörper antigene Determinanten auch der nicht-opsonisierbaren Stämme erkannten (Dot-Blot: III.1.2.).

Es stellte sich die Frage, wodurch die Heterogenität der Opsonisierbarkeit zustande kommt. Die Annahme, daß Fibrinogen des Blutplasmas an der Maskierung der Antikörperbindungsstellen auf dem M-Protein der nicht-opsonisierbaren Stämme beteiligt ist (Whitnack et al., 1984), kann ausgeschlossen werden, da die Antikörper vor Zugabe von Blutplasma mit den Streptokokkenzellen vorinkubiert wurden.

Ebenso konnte die Bedeutung unterschiedlicher Aviditäten des jeweiligen Antikörpers zu den verschiedenen Stämmen nicht bestätigt werden (Pincus et al., 1988), da im Dot-Blot-Test (III.1.2.), im ELISA mit Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen (III.2.2., Tab.5) und Inhibition der Antikörperreaktion mit Streptokokken in einem Ganzzell-ELISA mit diesen Proteinen (III.2.2., Tab.6) keine signifikanten Unterschiede zwischen opsonisierbaren und nicht-opsonisierbaren Stämmen auftraten.

Für den Antikörper PM II 40 wurde gezeigt (eigene Daten), daß eine unterschiedliche Bindung der 3. Komplementkomponente (C3) an dem Antikörper nicht verantwortlich ist für die unterschiedliche Opsonisierbarkeit der Stämme eines M-Typs. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Jones und Fischetti (1988), die zeigen, daß opsonogene und nicht-opsonogene Antikörper sich nicht in der Fähigkeit unterscheiden, Komplement zu fixieren.

Unterschiede in der Struktur der M-Proteine bzw. in der Lage der Epitope auf den M-Proteinen könnten für die beobachtete Heterogenität verantwortlich sein. Hollingshead et al. (1987b) veröffentlichten, daß die Größenvariation von M-Proteinen eines M-Typs durch homologe Rekombinationen innerhalb von intragenetischen Sequenzwiederholungen entstehen. Eine endgültige Klärung ergäbe sich erst aus einer genauen Epitopanalyse der M-Proteine.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die kreuzreaktiven Antigene der drei gegen Nierenantigene gerichteten Antikörper für alle drei Antikörper auf dem M-Protein der Gruppe A Streptokokken lokalisiert werden konnte. Durch die Isolierung nativer Oberflächenproteine mit Hilfe von Mutanolysin blieben auch diejenigen Determinanten erhalten, die durch Pepsinspaltung verloren gehen: A) durch Lokalisation der Determinante auf der carboxy-terminalen Hälfte des M-Proteins, die an den Bakterien verbleibt. B) durch Zerstörung bzw. Veränderung der antigenen Determinante durch die Enzymsspaltung. Dadurch konnten auch Kreuzreaktionen des Antikörpers Hyp II 120 im Western-Immunoblot nachgewiesen werden, die nach Pepsinspaltung nicht mehr vorhanden war. Die unterschiedlichen Antikörperreaktionen mit den limitiert Pepsin-extrahierten Oberflächenproteinen innerhalb eines Stammes sprechen für eine unterschiedliche Epitop-Erkennung der drei Antikörper und schließen IgM-unspezifische bzw. Fc-Rezeptor-Bindungen aus.

3. Identifizierung des glomerulären Antigens

Goroncy-Bermes (1987) identifizierte als Nierenantigen des Antikörpers PM II 40 ein 43 kD Protein, das er aus einem Nierenhomogenat im Western-

Immunoblot darstellen konnte. Dieses Protein wurde nicht weiter charakterisiert.

Zur Anreicherung von glomerulären Antigenen, die auch in einem Nierencortexbereich quantitativ geringer vorliegen als Nierentubuli-Antigene, wurden die Glomerula isoliert (Huang und Langlois, 1985; Kerjaschki et al., 1986) und mit SDS extrahiert. In diesen Extrakten konnte ein 43 kD Protein wiedergefunden werden; allerdings zeigten sich mit allen drei Antikörpern weitere gut ausgeprägte Banden vor allem in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 47 - 55 kD (III.6.2.). Diese Antigene scheinen in jeder normalen Niere vorzukommen. Nach den Immunogold-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Goroncy-Bermes, 1987) und Immunfluoreszenzaufnahmen, die eine eher zelluläre Fluoreszenz zeigen, war eine Beteiligung von Basalmembran-Antigenen nicht zu erwarten. Gegen eine Beteiligung sprechen auch die Molekulargewichte der immunreaktiven Proteine. Die Basalmembran wird hauptsächlich aus Collagen IV, Heparansulfat-Proteoglykanen und Fibronectin aufgebaut und enthält vorwiegend Laminin (Fouser und Michael, 1987). Diese extrazellulären Matrixantigene kamen von ihrem hohen Molekulargewichten nicht als Antigene in Betracht (Laminin: A-Kette 440 kD, B-Kette 220 kD; Fibronectin pro Kette ca. 250 kD; Collagen IV: $\alpha 1$ 180 kD, $\alpha 2$ 217 kD, Heparansulfat-Proteoglykane 210-350 kD (Fouser und Michael, 1987; Martinez-Hernandez, 1987)). Die immunreaktiven Proteine konnten nicht mit einer Schiff'schen Färbung zur Darstellung von Glykoproteinen angefärbt werden (Glossmann, und Neville 1971; eigene Daten), so daß kein Hinweis auf Glykoproteine vorlag.

Da die Antikörper mehrere Proteinbanden im Western-Immunoblot erkannten, stellte sich die Frage, ob es sich dabei um verschiedene Proteine oder um ein Protein handelt, das einem proteolytischen Abbau trotz Zusatz von

Proteaseinhibitoren unterliegt. Eine Aminosäureanalyse der verschiedenen Proteine sollte Aufschluß darüber geben. Bei SDS-Extraktion ganzer Glomerula schien es unmöglich aus der Vielzahl der Proteine in der SDS-PAGE die immunreaktiven Proteine den entsprechenden, Commassie-Blau gefärbten Proteinbanden zuzuordnen. Daher wurden die Glomerula mechanisch aufgeschlossen, so daß große Glomerulabestandteile, Membranen und lösliche Proteine voneinander getrennt werden konnten (III.6.3.1.). In der SDS-PAGE konnten nun einzelne Proteinbanden erkannt werden (III.6.3.1.). Da von den löslichen Proteinen keine immunreaktiven Proteine im Western-Immunoblot dargestellt werden konnte, wurde die Fraktion mit Membranen und unlöslichem Protein aufgetrennt und die immunreaktiven Proteine einer Gesamtaminosäure-Analyse unterzogen (III.6.4.). Die Aminosäurezusammensetzung ändert sich etwas von Molekulargewicht zu Molekulargewicht, aber nicht so drastisch, daß es sich um völlig unterschiedliche Proteine handeln könnte. Es scheint eher ein teilweise proteolytischer Abbau stattzufinden. Dabei fällt auf, daß es einen "Sprung" in der Veränderung der Aminosäurekomposition zwischen dem 49 und dem 50 kD Protein erfolgt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß es sich tatsächlich um zwei verschiedene, relativ nah verwandte Proteine (46-49 kD und 50-53 kD) handelt, die eine ähnliche Aminosäurekomposition besitzen, oder daß der proteolytische Abbau sowohl von der aminoterminalen als auch von der carboxyterminalen Seite des Proteins vonstatten geht.

Die Molekulargewichtsangaben für die isolierten Proteine stammen aus der SDS-PAGE. Die Angaben der Molekulargewichte sind mit einem gewissen Fehler behaftet, da die Standarddeichkurve der Molekulargewichtsmarker nur für den niederen Molekulargewichtsbereich linear verläuft. In dem 50 kD-Bereich ist die Linearität nicht mehr gegeben, so daß mit Abweichungen

vom eigentlichen Molekulargewicht von mindestens ± 2 kD gerechnet werden muß (Weber und Osborn, 1969).

Die Lokalisation der mit dem Antikörper PM II 40 reagierenden Antigene der Glomerula blieb mit den bisherigen Methoden unklar. Daher wurden ausgewachsene Podozytenzellen mit dem Antikörper inkubiert. Der Antikörper reagierte eindeutig mit Cytoskelett der Zellen (III.7.). Eine Beteiligung von Aktin konnte ausgeschlossen werden, da die Aktinfasern zumeist geordnet ausgerichtet sind (Osborn et al., 1977; Osborn et al., 1978) und eine Reaktion des Antikörpers mit Rindermuskel-Aktin nicht nachgewiesen werden konnte (eigene Daten). Die beobachtete 43 kD Proteinbande ist daher nicht auf Aktin zurückzuführen.

Als weitere Cytoskelett-Elemente bieten sich intermediäre Filamente an, die größtenteils den gefundenen Molekulargewichten entsprechen. Es gibt fünf Gruppen von intermediären Filamenten (Lazarides, 1982). Interessant für Podozyten und Mesangiumzellen sind vor allem Vimentin und Desmin. Cytokeratin bildet die vielfältigste Gruppe der intermediären Filamente, die aus 10-20 nah verwandten Proteinen mit Molekulargewichten von 40-70 kD besteht, und wird in den meisten Epithelzellen gefunden (Hanukoglu und Fuchs, 1982). Jedoch bilden die Podozyten, die Zellen des visceralen Deckepithels der Glomerula, eine Ausnahme. Sie besitzen kein Cytokeratin (Bachmann et al., 1983; Lazarides, 1982), sondern Vimentin, das normalerweise in Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie den Mesangiumzellen, auftritt (Franke et al., 1978). Glomeruläre Mesangiumzellen weisen neben Vimentin auch noch Desmin auf (Bachmann et al., 1983).

Im Western-Immunoblot reagierten die Antikörper PM II 40 und Hyp II 120 sowohl mit Vimentin als auch mit Desmin, während der Antikörper PM II 62

nur Vimentin erkannte (III.8.). Umfangreiche Sequenzhomologien von Vimentin unterschiedlicher Spezies sind beschrieben worden. Die Sequenz des Hamster-Vimentins zeigt 80% Homologie mit der des Huhns (Zehner et al., 1987), und Human-Vimentin ist zu 98% homolog zum Hamster-Vimentin (Quax et al., 1983). Die große Übereinstimmung in der Sequenz der Säugetier-Vimentine legt eine ähnliche Homologie für Human-Vimentin und Rinder-Vimentin, das in den Untersuchungen verwendet wurde, nahe. Dem Molekulargewicht des Human-Vimentins mit etwa 54 kD (Ferrari et al., 1986) könnte das 55 kD Protein aus dem Glomerulaextrakt entsprechen. Einige der kleineren Proteine scheinen aus dem proteolytischen Abbau des Vimentins zu stammen, der schon in früheren Untersuchungen für Vimentin beschrieben wurde (Franke et al., 1980; Lazarides, 1982). Ausgeprägte Sequenzhomologien haben auch das Schweine- und Huhn-Desmin, die umfangreicher sind, als die, die von Vimentin und Desmin einer Spezies stammen (Geisler et al., 1982; Steinert et al., 1983; Zehner et al., 1987). Auch im Falle von Desmin kann davon ausgegangen werden, daß relativ hohe Sequenzhomologien zwischen Huhn- und Human-Desmin vorliegen. Das Desmin von Säugetieren hat ein Molekulargewicht von 52 kD und ist ebenso wie Vimentin sensibel gegen eine spezifische Protease (Lazarides, 1982). Die erhaltenen Ergebnisse sprechen sehr dafür, daß als glomeruläre Antigene Vimentin und Desmin in Betracht kommen.

Ein Vergleich der bis jetzt bekannten Aminosäuresequenz des M-Typ 1-Proteins (Haanes-Fritz et al., 1988) mit der Aminosäuresequenz von humanen Vimentin (Ferrari et al., 1986) zeigt, daß diese Proteine nicht homolog zueinander sind. Die Aminosäuresequenz von humanem Desmin liegt noch nicht vor. Obwohl sie sich deutlich in ihrer Primärstruktur unterscheiden, haben Vimentin bzw. Desmin und das M1-Protein eine ähnliche Sekun-

därstruktur. Es sind α -helikale coiled-coil Proteine.

Vimentin und Desmin bestehen, wie die anderen intermediären Filamente auch, aus einer zentralen α -helikalen Stabdomäne, die von Enddomänen flankiert wird. Die α -helikale Region besitzt eine Sieben-Aminosäure-reste-Periodizität, durch die eine coiled-coil Struktur ausgebildet werden kann (Steinert et al. 1985; Steinert und Parry, 1985; Abb.2).

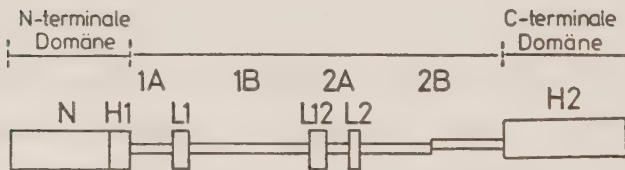


Abb. 2: Aufbau des Vimentins und des Desmins (Steinert und Parry, 1985).

N = sehr basische aminoterminal Domäne; H = Domäne die homolog ist zu Domänen der weiteren intermediären Filamente; 1A - 2B können coiled-coil Struktur ausbilden; L1, L12, L2 sind Linker-Regionen zwischen den coiled-coil Domänen, die keine Hepta-Periodizität zeigen.

Kraus und Beachey (1988) beschrieben Kreuzreaktionen von Kaninchenserum, die durch Immunisierung mit synthetischem M1-Peptid gewonnen wurden, mit menschlicher Niere. Das Immunfluoreszenzmuster mit den Glomerula sah dem in dieser Arbeit beschriebenen sehr ähnlich. Das kreuzreagierende Epitop auf dem M1-Protein konnte als das Tetrapeptid I R L R identifiziert werden, das sich an den Stellen 23-26 in der Aminosäuresequenz befindet. Affinitätschromatographisch-gereinigte I R L R-Antikörper wurden nicht

nur durch das I R L R -Peptid und dem synthetischen sM1 (1-26)C-Peptid in ihrer Reaktion mit renalen Glomerula gehemmt, sondern auch durch das Peptid pep M1, obwohl die Tetrapeptid-Sequenz in der Form nicht auf dem pep M1-Protein vorkommt. Kürzlich beschrieb Kraus et al. (1989), daß die I R L R- Antikörper mit Vimentin aus Ratten-Mesangiumzellen reagieren und identifizierten zwei Regionen auf dem menschlichen Vimentin als mögliche kreuzreaktive Determinanten, die als gemeinsame Aminosäuresequenz die Sequenz R L R mit dem Tetrapeptid des M1-Proteins aufweisen. Diese Ergebnisse bestätigen, daß antigene Determinanten auf dem menschlichen Vimentin existieren, die mit M1-Protein kreuzreagieren.

Die antigene Determinante, die mit dem Antikörper PM II 40 kreuzreagiert, ist nicht identisch mit dem Tetrapeptid I R L R an Aminosäureposition 23-26, das von Kraus und Beachey (1988) beschrieben wurde, da dieses Tetrapeptid auf dem 23 kD pep M1-Protein nicht vorhanden ist (Abb. 3). Außerdem reagierte der Antikörper PM II 40 im Unterschied zu dem in der obengenannten Studie verwendeten Antiserum mit Desmin.

N G D G N P R E V I E D L A A N N P A I Q N I R L R H E N K D L K A R L E
 N A M E V A G R D F K R A E E L E K A K Q A L E D Q R K D L E T K L K E L
 pep M1

 Q Q D Y D L A K E S T S W D R Q R L E K E L E E K K E A L E L A I D Q A S
 R D Y H R A T A L E K E L E E K K K A L E L A I K Q A S Q D Y N R A N V L
 E K E L E T I T R E

Abb.3: Aminosäuresequenz vom aminoterminalen Teil des M1-Proteins (Haanes-Fritz et al., 1988).

Das Tetrapeptid I R L R ist unterstrichen. Der Anfang des in dieser Untersuchung vorliegenden pep M1-Proteins ist markiert.

Kraus et al. (1989) weist ebenfalls mehrere Proteine von Ratten-Mesangiumzellen im Western-Immunoblot mit den I R L R - Antikörpern nach, die ein Molekulargewicht von 56, 52 und 49 kD haben, ähnlich dem der immunreaktiven Proteine der menschlichen Glomerula (III.6.2.).

Kreuzreaktionen von M-Protein rheumatogener Streptokokken und einer Cytoskelett-Komponente des Herzmuskels, dem Myosin, wurden schon früher nachgewiesen (Cunningham et al., 1986; Dale und Beachey, 1985a; Dale und Beachey, 1986; Krisher und Cunningham, 1986). Manjula et al. (1985, 1986) beschrieben Sequenzhomologien zwischen dem pep M5-Protein und Myosin und zeigten strukturelle Gemeinsamkeiten des pep M5-Proteins mit anderen coiled-coil Proteinen von Säugern auf, wie Myosin, Aktin, Keratin, Desmin und Vimentin.

Studien mit monoklonalen Mausantikörpern gegen M-Protein vom M-Typ 5 und menschlichem Herzwewebe zeigten, daß diese Antikörper mit Cytoskelett-Strukturen verschiedener Zellen reagierten (Cunningham und Swerlick, 1986). Ein Antikörper erkannte Myosin, Vimentin und DNA, während ein anderer mit Myosin, Aktin und Keratin reagierte. Es ist auch hier auffällig, daß es ausschließlich Antigene mit einer α -helikalen Struktur sind, die kreuzreagieren.

4. Hinweise auf mögliche kreuzreaktive Antikörper in Seren von APGN-Patienten

Es wurde schon länger an die Möglichkeit gedacht, daß Autoimmunreaktionen eine Rolle in der Pathogenese des akuten rheumatischen Fiebers spielen.

So wurden in Sera von Patienten nach akutem rheumatischem Fieber mit dem Herzmuskel reagierende Antikörper gefunden (Zabriskie et al., 1970). Diese konnten mit Komponenten der Gruppe A Streptokokken absorbiert werden (Zabriskie und Freimer, 1966), die von M-Protein (Dale und Beachey, 1982) oder Zellmembran-Präparationen stammten (van de Rijn et al., 1977). Patientenserum von an akutem rheumatischem Fieber erkrankten Patienten (ARF), von Patienten mit unkomplizierter Streptokokkeninfektion (USTR) und Normalserum wurden auf Antikörper gegen Myosin untersucht (Cunningham et al., 1988). Anti-Myosin-Antikörper wurden in 52% von Patientenserum mit USTR, in 88% der Seren nach ARF und in 7% der Fälle im Normalserum gefunden. Gruppe A Streptokokken können anscheinend auch in vivo Autoantikörper hervorrufen, die zwar ebenfalls in normalen Individuen nachgewiesen werden können, jedoch in einer viel geringeren Konzentration (Cunningham et al., 1988). Die Rolle der Autoantikörper gegen das menschliche Herz in der Pathogenese des akuten rheumatischen Fiebers ist nach wie vor ungeklärt.

In Seren von Patienten mit akuter Poststreptokokken-Glomerulonephritis wurden Antikörper gegen Basalmembran-Antigene nachgewiesen (Fillit et al. 1985; Kefalides et al., 1986). In den in dieser Untersuchung getesteten Patientenserum mit akuter Poststreptokokken-Glomerulonephritis konnten keine Antigene in der Molekulargewichtsgröße von Collagen, Laminin oder Heparansulfat-Proteoglykanen nachgewiesen werden. 65% der getesteten Patientenserum mit akuter Poststreptokokken-Glomerulonephritis reagierten mit SDS-extrahierten glomerulären Antigenen, die kleiner als 80 kD waren. Ähnlich den Untersuchungen an akutem rheumatischem Fieber (Cunningham et al., 1988) konnten auch in Seren von Patienten mit unkomplizierten Streptokokkeninfektionen und Normalserum Autoantikörper gegen Glomerula nachgewiesen werden (III.9.2.).

Antiseren von APGN-Patienten gegen homologe Gruppe A Streptokokkenstämme zeigten gegenüber dem Normalserum eine höhere Aktivität mit Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen dieser Stämme. Für die Seren gegen homologe APGN-Gruppe G-Streptokokkenstämme und gegen homologe Stämme, die keine Nacherkrankung hervorriefen, trifft dies mit Ausnahme des Stammes TT 17 nicht zu (III. 9.1.). Nach Identifizierung der vermutlichen glomerulären Antigene Vimentin und Desmin wurden in allen Patientenseren und Human-Normalseren Antikörper gegen Desmin nachgewiesen, während nur einige Patientenseren mit Vimentin reagierten (III.9.3.). Im Hinblick auf diese Ergebnisse ist es nicht auszuschließen, daß in menschlichem Serum, in gesteigertem Maß in Patientenseren, kreuzreaktive Antikörper gegen Trypsin-sensitive Oberflächenproteine von Streptokokken der Gruppe A und gegen die intermediären Filamente Vimentin und/oder Desmin vorliegen. Besonders deutlich zeigte sich dies bei dem Stamm APGN 40, in dessen homologen Antiserum auch opsonogene Antikörper nachgewiesen werden konnten.

5. Schlußbetrachtung

Im normalen, menschlichen Serum wurden verschiedene Autoantikörper gefunden. So konnten mit spezifischen Immunoabsorbentien Autoantikörper gegen Tubulin, Aktin, Thyroglobulin, Fetuin, Myoglobin, Albumin, Transferrin, Cytochrom C und Collagen nachgewiesen werden (Daar und Fabre, 1981; Grabar, 1983; Guilbert et al., 1982; Mackay, 1983). Grabar (1983) vertritt die Hypothese, daß geringe Mengen an Autoantikörpern der Beseitigung von zerstörtem oder gealtertem Gewebe dienen. Diese Hypothese sagt ebenfalls aus, daß die Menge der natürlich vorkommenden Serum-Autoanti-

körpern bestimmt wird durch die Menge an Autoantigenen: tritt ein normalerweise "verstecktes" Selbst-Antigen in Mengen auf, so daß die Beseitigung durch Enzyme oder Antikörper nicht effektiv genug stattfinden kann, verbleibt es in der Zirkulation und kann weitere Autoantikörperbildung stimulieren (Swartzwelder et al., 1988).

Nach dieser Hypothese ist es vorstellbar, daß in dem Falle einer Streptokokkeninfektion ein Überschuß an Selbst-Antigen durch kreuzreaktive, antigene Determinanten des M-Proteins vorliegen, und somit die Autoantikörperbildung stimuliert wird. Eine andere Hypothese zur Entstehung von Autoantikörpern wäre die Darbietung eines Selbst-Antigens in Verbindung mit einem Fremd-Antigen, in diesem Falle die kreuzreaktive Determinante auf dem als fremd erkannten M-Protein, und deren Erkennung als Fremdantigen und Stimulierung der Autoantikörperproduktion durch die T-Lymphozyten (Cooke et al., 1983). Ob diese Mechanismen eine Rolle in der Pathogenese der akuten Poststreptokokken-Glomerulonephritis spielen, ist jedoch unklar. Die Untersuchungen von Patienten mit und ohne APGN zeigten, daß für die getesteten Gruppe A APGN-Stämme Antikörper gegen Streptokokken-Oberflächenproteine als auch Antikörper gegen mögliche glomeruläre Antigene wie Desmin und Vimentin nachgewiesen wurden, wobei zu klären wäre, ob diese Antikörper auch mit Human-Vimentin und -Desmin reagieren, die nicht zur Verfügung standen. Desweiteren müßte untersucht werden, ob die Antikörper gegen Vimentin und Desmin identisch sind mit denen, die mit den Streptokokken-Antigenen reagieren.

Die Beteiligung von kreuzreaktiven Antikörpern an der Pathogenese der APGN nachzuweisen, ist sehr problematisch. Zum einen können Autoantikörper auch in Normalseren nachgewiesen werden. Zum anderen werden die beschriebenen Antigene auch im Zuge von Entzündungsprozessen freigesetzt, so daß

die Bildung von Antikörpern gegen Glomerula auch nach Beginn der Erkrankung stimuliert werden kann. Auch bei anderen Krankheiten können Autoantikörper gegen Cytoskelett-Proteine nachgewiesen werden (André-Schwartz et al., 1984; Guilbert et al., 1982; Williams und Lennon, 1986), so daß sich die Frage stellt, wie spezifisch diese Stimulationen im Zusammenhang mit der APGN sein könnten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen die Befunde, daß es im Laufe einer APGN zur Stimulierung von kreuzreagierenden Autoantikörpern kommen kann. Die Bedeutung dieser Befunde für die Pathogenese der APGN konnte jedoch nicht geklärt werden. Durch den Nachweis von kreuzreaktiven Determinanten auf dem M-Protein von Gruppe A Streptokokken und intermediären Filamenten der renalen Glomerula wurde deutlich, daß bei der Suche nach einem geeigneten Impfstoff gegen Streptokokkeninfektionen bei der Verwendung von M-Protein bzw. dessen Peptide nicht nur auf die Bildung von Autoantikörpern gegen Herzgewebe sondern auch auf die Stimulation von Autoantikörpern gegen renale Glomerula geachtet werden muß.

V. Zusammenfassung

Der Nachweis von kreuzreaktiven Determinanten auf Streptokokken und Nierengewebe als mögliche Ursache für die nichteitrige Streptokokkenfolgeerkrankung akute Poststreptokokken-Glomerulonephritis warf die Frage nach der Identität der die kreuzreaktiven Determinanten tragenden Antigene auf. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur Charakterisierung von kreuzreaktiven Determinanten auf Streptokokken und Nierengewebe durchgeführt.

Vorherige Untersuchungen von Goroncy-Bermes (1987) deuteten daraufhin, daß der monoklonale Mausantikörper PM II 40 H2 gegen menschliches Nierengewebe kreuzreaktive Determinanten auf dem M-Protein der Streptokokken der Gruppe A und Podozyten der menschlichen Glomerula erkannte. Zusätzlich zu dem Antikörper PM II 40 H2 wurden zur näheren Charakterisierung der kreuzreaktiven Determinanten von Streptokokken der Gruppe A und menschlichen renalen Glomerula zwei weitere monoklonale Mausantikörper mit der Bezeichnung PM II 62 A2 und Hyp II 120 D4 (IgM, Anti-Human-Glomerulum-Antikörper) eingesetzt.

Die drei Antikörper reagierten im Dot-Blot mit einer Reihe von Gruppe A, C und G Streptokokkenstämmen, wobei bei einigen Stämmen Unterschiede in der Reaktion mit den Antikörpern auftraten.

Durch Pepsinbehandlung ganzer Streptokokkenzellen des M-Typs 1 (Gruppe A) wurde ein 23 kD Peptid gewonnen, das mit dem Antikörper PM II 40 H2 kreuzreagierte. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz dieses Peptids mit der in der Literatur für M1-Protein veröffentlichte konnte dieses Peptid eindeutig als ein M1-Protein-Fragment identifiziert werden. Damit

ist zweifelsfrei bewiesen, daß der Antikörper PM II 40 H2 mit M-Protein der Gruppe A Streptokokken kreuzreagiert.

Die kreuzreaktiven Determinanten der Antikörper PM II 62 A2 und Hyp II 120 D4 scheinen ebenfalls auf dem M-Protein zu liegen. So konnten opsonogene Eigenschaften des Antikörpers PM II 62 A2 für Stämme der M-Typen 1, 6 und 12 in einem Opsonophagozytose-Test nachgewiesen werden. Streptokokken der Gruppe A werden nur dann phagozytiert, wenn Antikörper mit opsonogenen Determinanten des M-Proteins reagieren. Nicht-opsonogene Determinanten des M-Proteins werden durch diesen Test nicht erfaßt. Der Antikörper Hyp II 120 D4 opsonisierte keinen der getesteten Stämme. Die Reaktion des Antikörpers PM II 62 A2 konnte durch pepsinextrahierte M6-Protein-Fragmente (pep M6) inhibiert werden.

Im Western-Immunoblot mit Mutanolysin-extrahierten Oberflächenproteinen von Stämmen des M-Typs 1 und 6, bei denen sowohl der amino- als auch der carboxyterminale Teil der Proteine, insbesondere des M-Proteins erhalten blieb, reagierten alle drei Antikörper mit den gleichen Proteinen (M1-Stämme: 52-45 kD, M6 Ref-Stamm: 52 kD, M6 BL-Stamm: 58-53, 50-47, 37-32 kD). Da zweifelsfrei nachgewiesen wurde, daß der Antikörper PM II 40 H2 mit M-Protein reagiert, ist daraus zu folgern, daß die reagierenden Proteine das M-Protein der untersuchten Stämme darstellen, und daß die beiden Antikörper PM II 62 A2 und Hyp II 120 D4, da sie mit den gleichen Proteinen wie der Antikörper PM II 40 H2 reagieren, auch M-Protein erkennen. Die Trypsin-Sensibilität der antigenen Determinanten der drei Antikörper unterstützt diese Folgerung, da M-Protein im Gegensatz zu einigen anderen Oberflächenproteinen Trypsin-sensibel ist.

Die Epitope der einzelnen Antikörper auf dem M-Protein wurden durch Vergleich der Antikörperreaktionen mit Pepsin-behandelten und unbehandelten Streptokokken und mit Pepsin-extrahierten Proteinen im ELISA lokalisiert. Die Epitope der Antikörper PM II 62 A2 und PM II 40 H2 befinden sich vor allem auf der aminoterminalen Hälfte des M-Proteins, während der Antikörper Hyp II 120 D4 ausschließlich mit Epitopen reagiert, die auf der carboxyterminalen Hälfte des M-Proteins liegen.

Die glomerulären Antigen-tragenden Proteine wurden von isolierten Glomeruli gewonnen. Im Western-Immunoblot reagierten die drei Antikörper zusätzlich zu dem schon von Goroncy-Bermes (1987) beschriebenen 43 kD Protein mit Proteinen in einem Molekulargewichtsbereich von 55, 50 und 47 kD. Aminosäureanalysen belegen, daß diese Proteine aus einem oder zwei nah verwandten Proteinen stammen, die proteolytisch angedaut wurden.

Die antigenen Determinanten von in Kultur angezüchteten Podozytenzellen wurden in einem Immunfluoreszenz-Test nachgewiesen. Dabei zeigte sich, daß der Antikörper PM II 40 H2 eindeutig mit Cytoskelett reagiert.

Die als Cytoskelettkomponenten in Frage kommenden intermediären Filamente Vimentin und Desmin wurden im Western-Immunoblot von den Antikörpern PM II 40 H2 und Hyp II 120 D4 erkannt. Der Antikörper PM II 62 A2 reagierte nur mit Vimentin.

Untersuchungen mit Seren von Patienten mit und ohne akute Poststreptokokken-Glomerulonephritis (APGN) und den isolierten, homologen Patientenstämmen zeigten, daß Antikörper gegen Oberflächenproteine von Gruppe A-Patientenstämmen in erhöhtem Maß in APGN-Seren gefunden wurden. Glomeruläre Antigene wurden von 65% der getesteten APGN-Seren erkannt. Antikör-

per gegen Desmin scheinen in allen getesteten Seren vorzuliegen, auch in Normalseren. Mit Vimentin reagierten einige Seren von Patienten mit und ohne APGN.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß Vimentin und/oder Desmin als glomeruläre Antigene der monoklonalen Mausantikörper in Betracht kommen, die kreuzreaktive Determinanten auf dem M-Protein von Gruppe A Streptokokken erkennen.

Ähnliche Antikörper können auch im Humanserum nachgewiesen werden. Allerdings scheinen Antikörper gegen Desmin auch in Normalseren vorzuliegen. Unterschiede in der Reaktion mit Vimentin zwischen Seren von Patienten mit und ohne APGN sind jedoch nicht nachzuweisen. Antikörper gegen glomeruläre Antigene konnten in Humanserum nachgewiesen werden. Ob diese Antikörper jedoch an der Pathogenese der APGN beteiligt sind, ist zur Zeit noch unklar.

VI. Literaturverzeichnis

- Andres, G. A.; Accinni, L.; Hsu, K.C.; Zabriskie, J. B.; Seegal, B. C. (1965). Electron microscopic studies of human glomerulonephritis with ferritin-conjugated antibody.
J. Exp. Med. 123: 399-412
- André-Schwartz, J.; Datta, S. K.; Shoenfeld, Y.; Isenberg, D. A.; Stollar, B. D.; Schwartz, R. S. (1984). Binding of cytoskeletal proteins by monoclonal anti-DNA lupus autoantibodies.
Clin. Immunol. Immunopathol. 31: 261-271
- Andrews, P. (1988). Morphological alterations of the glomerular (visceral) epithelium in response to pathological and experimental studies.
J. Electron Microsc. Techn. 9: 115-144
- Atassi, M. Z. (1984). Antigenic structure of proteins.
Their determination has revealed important aspects of immune recognition and generated strategies for synthetic mimicking of protein binding sites.
Eur. J. Biochem. 145: 1-20
- Bachmann, S.; Kriz, W.; Kuhn, C.; Franke, W. W. (1983). Differentiation of cell types in the mammalian kidney by immunofluorescence microscopy using antibodies to intermediate filament proteins and desmoplakins.
Histochemistry 77: 365-394
- Barnham, M.; Thornton, T. J.; Lange, K. (1983). Nephritis caused by *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C).
Lancet i: 945-948
- Beachey, E. H. (1986). Type-specific opsonic antibodies evoked with a synthetic peptide of streptococcal M protein conjugated to polylysine without adjuvant.
Infect. Immun. 51: 362-364
- Beachey, E. H.; Seyer, J. M.; Kang, A. H. (1978). Repeating covalent structure of streptococcal M protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3163-3167
- Beachey, E. H.; Stollerman, G. H.; Chiang, E. Y.; Chiang, T. M.; Seyer, J. M.; Kang, A. H. (1977). Purification and properties of M protein extracted from group A streptococci with pepsin: covalent structure of the amino-terminal region of type 24 M antigen.
J. Exp. Med. 145: 1469-1483

- Becker, C. G. (1964) Selection of group A streptococci rich in M protein from populations poor in M protein.
Am. J. Pathol. 44: 51-60
- Becker, C. G. (1967). Enhancing effect of type specific antistreptococcal antibodies on emergence of streptococci rich in M protein.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124: 331-335
- Benacerraf, B.; Unanue, E. R. (1982). Immunologische Toleranz.
In: Immunologie. Herausgeber: Benacerraf, B.; Unanue, E. R. Walter de Gruyter-Verlag, Berlin-New York. S. 153-162
- Benslimane, A.; Veyseyre, C.; Rotta; J., Bellaton, A.M., Carraz, M. (1986). Streptococcal group A polysaccharide antibodies assayed by an ELISA determination of antibodies in rabbit hyperimmune sera; normal levels in man and comparison with levels in patients with rheumatic fever and with poststreptococcal glomerulonephritis.
Zbl. Bakt. Hyg. A 262: 385-395
- Bergey, E. J.; Stinson, M. W. (1988). Heparin-inhibitable basement membrane-binding protein of *Streptococcus pyogenes*.
Infect. Immun. 56: 1715-1721
- Bernheimer, A.W. (1967). Physical behavior of streptolysin S.
J. Bact. 93: 2024-2025
- Bessen, D.; Fischetti, V.A. (1988a). Passive acquired mucosal immunity to group A streptococci by secretory immunoglobulin A.
J. Exp. Med. 167: 1945-1950
- Bessen, D.; Fischetti, V.A. (1988b). Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M protein on mucosal colonization by group A streptococci.
Infect. Immun. 56: 2666-2672
- Bhakdi, S.; Roth, M.; Sziegoleit, A.; Tranum-Jensen, J. (1984). Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin-O.
Infect. Immun. 46: 394-400
- Bisno, A. L. (1979). Alternate complement pathway activation by group A streptococci: role of M-protein.
Infect. Immun. 26: 1172-1176

- Bisno, A. L. (1980). The concept of rheumatogenic and nonrheumatogenic group A streptococci.
In: Streptococcal diseases and the immune response. Herausgeber:
Read, S.S.; Zabriskie, J. B. Academic Press, New York-London-
Toronto-Sidney-San Francisco. S. 789-803
- Bisno, A. L.; Craven, D. E.; McCabe. (1987). M proteins of group G streptococci isolated from bacteremic human infections.
Infect. Immun. 55: 753-757
- Bisno, A. L.; Svartman, M.; Stollerman, G. H. (1971). Cross-reacting and monotypic T antigens of nephritogenic pyoderma streptococci: the type 56 system.
J. Immunol. 106: 1493-1498
- Björck, L.; Kronvall, G. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent.
J. Immunol. 133: 969-973
- Blue, W. T.; Lange, C. F.; Agostino, G.; Chase, K.; Markowitz, A. S. (1980). The role of glycoprotein carbohydrate in the immunological reactivity of antistreptococcal cell membrane and antiglomerular basement membrane antisera.
J. Med. Microbiol. 13: 323-327
- Bronze, M. S.; Mc Kinsey, D. S.; Beachey, E. H.; Dale, J. B. (1988). Protective immunity evoked by locally administered group A streptococcal vaccines in mice.
J. Immunol. 141: 2767-2770
- Burnette, W. N. (1981). "Western-Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.
Anal. Biochem. 112: 195-203
- Caparon, M. G.; Scott, J. R. (1987). Identification of a gene that regulates expression of M protein, the major virulence determinant of group A streptococci.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8677-8681
- Chalovich, J. M.; Fischetti, V. A. (1986). Crosslinking of actin filaments and inhibition of actomyosin subfragment-1 ATPase activity by streptococcal M6 protein.
Arch. Biochem. Biophys. 245: 37-43

- Christensen, P.; Burova, L. A.; Grubb, A.; Grubb, R.; Samuelsson, G.; Schalén, C.; Svensson, M.-L. (1979 a). Interaction of the Fc part of IgG with Lancefield extracts of hemolytic streptococci. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C* 87: 73-77
- Christensen, P.; Schalén, C.; Holm, S. E. (1979 b). Reevaluation of experiments intended to demonstrate immunological cross-reactions between mammalian tissues and streptococci. *Prog. Allergy* 26: 1-41
- Clegg, S.; Evans, D. G.; Evans, J. R. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitating the humoral immune response to the colonization factor antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 27: 525-531
- Coligan, J. E.; Kindt, T. J.; Krause, R. R. (1978). Structure of the streptococcal groups A, A-variant, and C carbohydrates. *Immunochemistry* 15: 755-760
- O'Connor, S. P.; Cleary, P. P. (1987). In vivo *Streptococcus pyogenes* C5a peptidase activity analysis using transposon- and nitrosoguanidine-induced mutants. *J. Infect. Dis.* 156: 495-504
- Cooke, A.; Lydyard, P. M.; Roitt, I. M. (1983). Mechanisms of autoimmunity: a role for cross-reactive idiotypes. *Immunol. Today* 4: 170-175
- Coons, A. H.; Kaplan, M. H. (1950). Localization of antigen in tissue cells. II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* 91: 1-13
- Cunningham, C. M.; Barsumian, E. L.; Watson, D. W. (1976). Further purification of group A streptococcal pyrogenic exotoxin and characterization of the purified toxin. *Infect. Immun.* 14: 767-775
- Cunningham, M. W.; Hall, N. K.; Krisher, K. K.; Spanier, A. M. (1986). A study of anti-group A streptococcal monoclonal antibodies cross-reactive with myosin. *J. Immunol.* 136: 293-298
- Cunningham, M. W.; McCormack, J. M.; Talaber, L. R.; Harley, J. B.; Ayoub, E. M.; Muneer, R. S.; Chun, L. T.; Reddy, D. V. (1988). Human monoclonal antibodies reactive with antigens of the group A streptococcus and human heart. *J. Immunol.* 141: 2760-2766

- Cunningham, M. W.; Russell, S. M. (1983). Study of heart-reactive antibody in antisera and hybridoma culture fluids against group A streptococci.
Infect. Immun. 42: 531-538
- Cunningham, M. W., Swerlick, R. A. (1986). Polyspecificity of antistreptococcal murine monoclonal antibodies and their implications in autoimmunity.
J. Exp. Med. 164: 998-1012
- Daar, A. S.; Fabre, J.W. (1981). Organ-specific IgM autoantibodies to liver, heart and brain in man: generalized occurrence and possible functional significance in normal individuals, and studies in patients with multiple sclerosis.
Clin. Exp. Immunol. 45: 37-47
- Dale, J. B.; Beachey, E. H. (1982). Protective antigenic determinant of streptococcal M protein shared with sarcolemmal membrane protein of human heart.
J. Exp. Med. 156: 1165-1176
- Dale, J. B.; Beachey, E. H. (1985 a). Multiple, heart-cross-reactive epitopes of streptococcal M proteins.
J. Exp. Med. 161: 113-122
- Dale, J. B.; Beachey, E. H. (1985 b). Epitopes of streptococcal M proteins shared with cardiac myosin.
J. Exp. Med. 162: 583-591
- Dale, J. B.; Beachey, E. H. (1986). Sequence of myosin-crossreactive epitopes of streptococcal M protein.
J. Exp. Med. 164: 1785-1790
- Derrick, C. W.; Reeves, M. S.; Dillon, H. C. (1970). Complement in overt and asymptomatic nephritis after skin infection.
J. Clin. Invest. 49: 1178-1187
- Dillon, Jr., H. C. (1967). Pyoderma and nephritis.
Ann. Rev. Med. 18: 207-218
- Duncan, J. L. (1974). Characteristics of streptolysin O hemolysis: kinetics of hemoglobin and ⁸⁶Rubidium release.
Infect. Immun. 9: 1022-1027

- Duncan, J. L.; Buckingham, L. (1980). Resistance to streptolysin O in mammalian cells treated with oxygenated derivatives of cholesterol. Cholesterol content of resistant cells and recovery of streptolysin O sensitivity. *Biochim. Biophys. Acta* 603: 278-287
- Duncan, J. L.; Schlegel, R. (1975). Effect of streptolysin O on erythrocyte membranes, liposomes, and lipid dispersions. A protein-cholesterol interaction. *J. Cell Biol.* 67: 160-173
- Ey, P. L.; Prowse, S. J.; Jenkin, C. R. (1978). Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* 15: 429-436
- Falkenberg, F. W.; Müller, E.; Riffelmann, H.-D.; Behrendt, B.; Waks, T. (1981). The production of monoclonal antibodies against glomerular and other antigens of the human nephron. *Renal Physiol.* 4: 150-156
- Feldmann, J. D.; Mardiney, M. R.; Shuler, S. E. (1966). Immunology and morphology of acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 15, 283-301
- Ferrari, S.; Battini, R.; Kaczmarek, L.; Rittling, S.; Calabretta, B.; de Riel, J. K.; Philiponis, V.; Wei, J.-F.; Baserga, R. (1986). Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol. Cell. Biol.* 6: 3614-3620
- Fillit, H.; Damle, S. P.; Gregory, J. D.; Volin, C.; Poon-King, T.; Zabriskie, J. (1985). Sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis contain antibodies to glomerular heparan sulfate proteoglycan. *J. Exp. Med.* 161: 277-289
- Fischetti, V. A. (1983). Requirements for the opsonic activity of human IgG directed to type 6 group A streptococci: net basic charge and intact Fc-region. *J. Immunol.* 130: 896-902
- Fischetti, V. A.; Jones, K. F.; Hollingshead, S.; Scott, J. R. (1987). Molecular and antigenic architecture of the antiphagocytic group A streptococcal M protein. In: *Molecular basis of viral and microbial pathogenesis*. 38. Colloquium Mosbach, 1987. Herausgeber: Rott, R.; Goebel, W. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. S. 123-131

- Fischetti, V. A.; Jones, K. F.; Scott, J. R. (1985). Size variation of the M protein in group A streptococci.
J. Exp. Med. 161: 1384-1401
- Fischetti, V. A.; Parry, D. A. D.; Trus, B. L.; Hollingshead, S. K.; Scott, J. R.; Manjula, B. N. (1988). Conformational characteristics of the complete sequence of group A streptococcal M6 protein.
Proteins: Struct. Func. Genet. 3: 60-69
- Fischetti, V. A.; Windels, M. (1988). Mapping the immunodeterminants of the streptococcal M6 protein molecule. Identification of an immunodominant region.
J. Immunol. 141: 3592-3599
- Fitzsimons, Jr., E. J.; Weber, M.; Lange C. F. (1987). The isolation of cross-reactive monoclonal antibodies: hybridomas to streptococcal antigens cross-reactive with mammalian basement membrane.
Hybridoma 6: 61-69
- Fouser, L. S.; Michael, A. F. (1987). Antigens of the human glomerular basement membrane.
Springer Semin. Immunopathol. 9: 317-339
- Franke, W. W.; Schmid, E.; Osborn, M.; Weber, K. (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5034-5038
- Franke, W. W.; Schmid, E.; Vandekerckhove, J.; Weber, K. (1980). A permanently proliferating rat vascular smooth muscle cell with maintained expression of smooth muscle characteristics, including actin of the vascular smooth muscle type.
J. Cell. Biol. 87: 594-600
- Galán, J. E.; Timoney, J. F. (1987). Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi* and cloning and expression of the M protein gene in *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 55: 3181-3187
- Gaworzewska, E.; Colman, G. (1988). Changes in the pattern of infection caused by *Streptococcus pyogenes*.
Epidemiol. Infect. 100: 257-269
- Geisler, N.; Plessmann, U.; Weber, K. (1982). Related amino acid sequences in neurofilaments and non-neuronal intermediate filaments.
Nature 296: 448-450

- Ginsburg, I. (1970). Streptolysin S.
In: Microbial Toxins, Vol. III; Bacterial protein toxins.
Herausgeber: Montie, T. C.; Kadis, S., Ajl, S. J. Academic Press,
New York. S. 99-171
- Glossmann, H.; Neville, Jr., D. M. (1971). Glycoproteins of cell
surfaces. A comparative study of three different cell surfaces of
the rat.
J. Biol. Chem. 246: 6339-6346
- Goroncy-Bermes, P. (1987). Antikörperkreuzreaktionen zwischen M-Protein
von Streptococcus pyogenes und menschlichem Nierengewebe.
Dissertation, Bochum
- Goroncy-Bermes, P.; Dale, J. B.; Beachey, E. H.; Opferkuch, W. (1987).
Monoclonal antibody to human renal glomeruli cross-reacts with
streptococcal M protein.
Infect. Immun. 55: 2416-2419
- Grabar, P. (1983). Autoantibodies and the physiological role of
immunoglobulins.
Immunol. Today 4: 337-340
- Griffin, F. M.; Griffin, J. A.; Leider, J. E.; Silverstein, S. C. (1975).
Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for
circumferential attachment of particle-bound ligands to specific
receptors on the macrophage plasma membrane.
J. Exp. Med. 142: 1263-1282
- Grubb, A.; Grubb, R.; Christensen, P.; Schalén, C. (1982). Isolation and
some properties of an IgG Fc-binding protein from group A
streptococci type 15.
Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 67: 369-376
- Guilbert, B.; Dighiero, G.; Avrameas, S. (1982). Naturally occurring
antibodies against nine common antigens in human sera. I.
Detection, isolation, and characterization.
J. Immunol. 128: 2779-2787
- Haanes-Fritz, E.; Kraus, W.; Burdett, V.; Dale, J. B.; Beachey, E. H.,
Cleary, P. (1988). Comparison of the leader sequences of four group
A streptococcal M protein genes.
Nucleic Acids Res. 16: 4667-4677
- Hanukoglu, I.; Fuchs, E. (1982). The cDNA sequence of a human epidermal
keratin: divergence of sequence but conservation of structure among
intermediate filament proteins.
Cell 31: 243-252

- Havlicek, J.; Pokomy, J.; Havlicková, H. (1987). Quantitative character of fibrinogen uptake by M⁺ and M⁻ variants of *Streptococcus pyogenes*.
Zbl. Bakt. Hyg. A 265: 1-11
- Herdson, P. B.; Jennings, R. B.; Earle, D.P. (1966). Glomerular fine structure in poststreptococcal acute glomerulonephritis.
Arch. Pathol. 81: 117-128
- Hirsch, J. G.; Church, A. B. (1960). Studies of phagocytosis of group A streptococci by polymorphnuclear leucocytes in vitro.
J. Exp. Med. 111: 309-322
- Hollingshead, S. K.; Fischetti, V. A.; Scott, J. R. (1986). Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of the group A streptococcus. Repetitive structure and membrane anchor.
J. Biol. Chem. 261: 1677-1686
- Hollingshead, S. K.; Fischetti, V. A.; Scott, J. R. (1987a). A highly conserved region present in transcripts encoding heterologous M proteins of group A streptococci.
Infect. Immun. 55: 3237-3239
- Hollingshead, S. K.; Fischetti, V. A.; Scott, J. R. (1987b). Size variation in group A streptococcal M protein is generated by homologous recombination between intragenic repeats.
Mol. Gen. Genet. 207: 196-203
- Holm, S. H. (1967). Precipitinogens in beta-hemolytic streptococci and some related human kidney antigens.
Acta Path. et Microbiol. Scandinav. 70: 79-94
- Horstmann, R. D.; Sievertsen, H. J.; Knobloch, J.; Fischetti, V. A. (1988). Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: Selective binding of complement control protein factor H.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1657-1661
- Houston, C. W.; Ferretti, J. J. (1981). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A streptococcal exotoxin: Kinetics and regulation during growth of *Streptococcus pyogenes*.
Infect. Immun. 33: 862-869
- Hruby, D. E.; Hodges, W. M.; Wilson, E. M.; Franke, C. A.; Fischetti, V. A. (1988). Expression of streptococcal M protein in mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5714-5717

- Hryniewicz, W.; Pryjma, J. (1977). Effect of Streptolysin S on human and mouse T and B lymphocytes.
Infect. Immun. 16: 730-733
- Huang, T. W.; Langlois, J. C. (1985). Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium.
J. Exp. Med. 162: 245-267
- Jacks-Weis, J.; Kim, Y.; Cleary, P. P. (1982). Restricted deposition of C3 on M⁺ group A streptococci: correlation with resistance to phagocytosis.
J. Immunol. 128: 1897-1902
- Jaton, J.-C.; Brandt, D. C.; Vassalli, P. (1979). The isolation and characterization of immunoglobulins, antibodies, and their constituent polypeptide chains.
In: Immunological Methods, Vol. I. Herausgeber: Lefkovits, I.; Pernis, B. Academic Press, New York-San Francisco- London, S. 47-48
- Johnson, L. P.; Schlievert, P. M.; Watson, D. W. (1980). Transfer of group A streptococcal pyrogenic exotoxin production to nontoxic strains by lysogenic conversion.
Infect. Immun. 28: 254-257
- Johnson, R. H.; Beachey, E. H. (1979). Purification and immunobiological properties of R antigen and its relation to M protein of type 3 group A Streptococcus.
Infect. Immun. 25: 1015-1059
- Johnston, K. H.; Zabriskie, J. B. (1986). Purification and partial characterization of the nephritis strain-associated protein from Streptococcus pyogenes, group A.
J. Exp. Med. 163: 697-712
- Jones, K. F.; Fischetti, V. A. (1987). Biological and immunochemical identity of M protein on group G streptococci with M protein on group A streptococci.
Infect. Immun. 55: 502-506
- Jones, K. F.; Fischetti, V. A. (1988). The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci.
J. Exp. Med. 167: 1114-1123
- Jones, K. F.; Khan, S. H.; Erickson, B. W.; Hollingshead, S. K.; Scott, J. R.; Fischetti, V. A. (1986). Immunochemical localization and amino acid sequences of crossreactive epitopes within the group A streptococcal M6 protein.
J. Exp. Med. 164: 1226-1238

- Jones, K. F.; Manjula, B. N.; Johnston, K. H.; Hollingshead, S. K.; Scott, J. R.; Fischetti, V. A. (1985). Location of variable and conserved epitopes among the multiple serotypes of streptococcal M protein.
J. Exp. Med. 161: 623-628
- Kass, E. H.; Seastone, C. V. (1944). The role of mucoid polysaccharide (hyaluronic acid) in the virulence of group A hemolytic streptococci.
J. Exp. Med. 79: 319-330
- Kefalides, N. A.; Pegg, M. T.; Ohno, N.; Poon-King, T.; Zabriskie, J.; Fillit, H. (1986). Antibodies to basement membrane collagen and to laminin are present in sera from patients with poststreptococcal glomerulonephritis.
J. Exp. Med. 163: 588-602
- Kerjaschki, D.; Poczewski, H.; Dekan, G.; Horvat, R.; Balzar, E.; Kraft, N.; Atkins, R. C. (1986). Identification of a major sialoprotein in the glycocalyx of human visceral glomerular epithelial cells.
J. Clin. Invest. 78: 1142-1149
- Khandke, K. M.; Fairwell, T.; Manjula, B. N. (1987). Difference in the structural features of streptococcal M proteins from nephritogenic and rheumatogenic serotypes.
J. Exp. Med. 166: 151-162
- Khandke, K. M.; Fairwell, T.; Acharya, A. S.; Trus, B. L.; Manjula, B. N. (1988). Complete amino acid sequence of streptococcal pep M49 protein, a nephritis-associated serotype. Conserved conformational design among sequentially distinct M protein serotypes.
J. Biol. Chem. 263: 5075-5082
- Kim, Y. B.; Watson, D. W. (1972). Streptococcal exotoxins: Biological and pathological properties.
In: Streptococci and streptococcal diseases. Recognition, understanding, and management. Herausgeber: Wannamaker, L. W.; Matsen J. M. Academic Press, New York. S. 33-50
- Koyama, J. (1963). Biochemical studies on streptolysin S. II. Properties of a polypeptide component and its role in the toxin activity.
J. Biochem. 54: 146-151
- Kraus, W.; Beachey, E. H. (1988). Renal autoimmune epitope of group A streptococci specified by M protein tetrapeptide Ile-Arg-Leu-Arg.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4516-4520

- Kraus, W.; Haanes-Fritz, E.; Cleary, P. P.; Seyer, J. M.; Dale, J. B.; Beachey, E. H. (1987). Sequence and type-specific immunogenicity of the amino-terminal region of type 1 streptococcal M protein. *J. Immunol.* 139: 3084-3090
- Kraus, W.; Ohyama, K.; Snyder, D. S.; Beachey, E. H. (1989). Autoimmune sequence of streptococcal M protein shared with the intermediate filament protein, vimentin. *J. Exp. Med.* 169: 481-492
- Krause, R. M. (1972). The streptococcal cell: relationship of structure, function, and pathogenesis. In: *Streptococci and streptococcal diseases: recognition, understanding, and management.* Herausgeber: Wannamaker, L. W.; Matsen, J. M. Academic Press, New York. S. 3-18
- Krisher, K.; Cunningham, M. W. (1985). Myosin: a link between streptococci and heart. *Science* 227: 413-415
- Kronvall G. (1973). A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. *J. Immunol.* 111: 1401-1406
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lancefield, R. C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571-595
- Lancefield, R. C. (1940). The significance of M and T antigens in the cross reactions between certain types of group A hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 71: 539-550
- Lancefield, R. C. (1958). Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types, with special reference to the bactericidal test. *J. Exp. Med.* 106: 525-544
- Lancefield, R. C. (1962). Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J. Immunol.* 89: 307-313

- Lancefield, R. C.; Dole, V. P. (1946). The properties of T antigens extracted from group A hemolytic streptococci.
J. Exp. Med. 84: 449-471
- Lancefield, R. C.; Perlmann, G. E. (1952). Preparation and properties of type-specific M antigen isolated from group A, type 1 hemolytic streptococcus.
J. Exp. Med. 96: 71-82
- Lange, C. F. (1980) Antigenicity of kidney glomeruli: evaluations by antistreptococcal cell membrane antisera.
Transplant. Proc. 12, Suppl. 1,: 82-87
- Lange, C. F.; Weber, M.; Nayyar, R. P. (1986). Age effects on the reactivity of antistreptococcal cell membrane antisera to murine glomerular basement membrane.
Renal Physiol. 9: 148-159
- Lange, K.; Ahmed, U.; Kleinberger, H.; Treser, G. (1976). A hitherto unknown streptococcal antigen and its probable relation to acute poststreptococcal glomerulonephritis.
Clin. Nephrol. 5: 207-215
- Lange, K.; Gold, M. M. A.; Weiner, D.; Simon, V. (1949). Autoantibodies in human glomerulonephritis.
J. Clin. Invest. 28: 50-55
- Lange, K.; Seligson, G.; Cronin, W. (1983). Evidence for the in situ origin of poststreptococcal glomerulonephritis: glomerular localization of endostreptosin and the clinical significance of the subsequent antibody response.
Clin. Nephrol. 19: 3-10
- Langer, K. H. (1985). Biophysikochemische Strukturen des glomerulären Filters.
Klin. Wochenschr. 63: 835-849
- Laussucq, S.; Ware, J.; Facklam, R.; Cohen, M. L. (1986). Acute rheumatic fever on the rise in Utah.
In: Abstracts. Annual Meeting of the Lancefield Society, Oct. 1. 1986, New Orleans. S. 10
- Lazarides, E. (1982). Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins.
Ann. Rev. Biochem. 51: 219-250

- Lennon, D; Martin, D.; Wong, E.; Taylor, L. R. (1988). Longitudinal study of poststreptococcal disease in Auckland; rheumatic fever, glomerulonephritis, epidemiology and M typing 1981-86. N. Z. Med. J. 101: 396-398
- Lichtman, M. A.; Weed, R. J. (1970). Electrophoretic mobility and N-acetylneuraminic acid content of human normal and leukemic lymphocytes and granulocytes. Blood 35: 12-22
- Liu, C. T.; McCrory, W. W. (1958). Autoantibodies in human glomerulonephritis and nephrotic syndrome. J. Immunol. 81: 492-498
- Longcope, W. T., O'Brien, D. P.; McGuire, J.; Hansen, O. C.; Denny, E. R. (1928). Relationships of acute infections to glomerular nephritis. J. Clin. Invest. 5: 7-30
- Lugtenberg, B.; Meijers, J.; Peters, R.; van der Hoek, P.; van Alphen, L. (1975). Electrophoretic resolution of the "major outer membrane protein" of *Escherichia coli* K 12 into four bands. FEBS Lett. 58: 254-258
- Lütticken, R. (1984). Die Familie der Streptococcaceae. In: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Herausgeber: Brandis, H.; Otte, H. J. Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart-New York. S. 368-375
- Lyampert, I. M.; Danilova, T. A. (1975). Immunological phenomena associated with cross-reactive antigens of micro-organisms and mammalian tissues. Prog. Allergy 8: 423-477
- Mackay, I. R. (1983). Natural autoantibodies to the fore - forbidden clones to the rear? Immunol. Today 4: 340-342
- Majeed, H. A.; Khuffash, F. A.; Yousof, A. M.; Farwana, S. S.; Chugh, T. D.; Moussa, M. A. A.; Rotta, J., Havlickova, H. (1986). The concurrent associations of group A streptococcal serotypes in children with acute rheumatic fever or pharyngitis-associated glomerulonephritis and their families in Kuwait. Zbl. Bakt. Hyg. A 262: 346-356
- Majeed, H. A.; Khuffash, F. A.; Yousof, A. M.; Farwana, S. S.; Chugh, T. D.; Rotta, J. (1988). The rheumatogenic and nephritogenic strains of the group A streptococcus: the Kuwait experience. N. Z. Med. J. 101: 398-401

- Manjula, B. N.; Acharya, S.; Fairwell, T.; Fischetti, V. A. (1986). Antigenic domains of the streptococcal pep M5 protein . Localization of epitopes crossreactive with type 6 M protein and identification of a hypervariable region of the M molecule. J. Exp. Med. 163: 129-138
- Manjula, B. N., Acharya, A. S.; Mischa, S. M.; Fairwell, T.; Fischetti, V. A. (1984). The complete amino acid sequence of a biologically active 197-residue fragment of M protein isolated from type 5 group A streptococci. J. Biol. Chem. 259: 3686-3693
- Manjula, B. N.; Fischetti, V. A. (1980 a). Tropomyosin-like seven residue periodicity in three immunologically distinct streptococcal M proteins and its implications for the antiphagocytic property of the molecule. J. Exp. Med. 151: 695-708
- Manjula, B. N.; Fischetti, V. A. (1980 b). Studies on group A streptococcal M-proteins: purification of type 5 M-protein and comparison of its amino terminal sequence with two immunologically unrelated M-protein molecules. J. Immunol. 124: 261-267
- Manjula, B. N.; Trus, B. L.; Fischetti, V. A. (1985). Presence of two distinct regions in the coiled-coil structure of the streptococcal pep M5 protein: relationship to mammalian coiled-coil proteins and implications to its biological properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1064-1068
- Markowitz, A. S.; Armstrong, S. H.; Kushner, D. S. (1960). Immunological relationship between the rat glomerulus and nephritogenic streptococci. Nature 187: 1095-1097
- Markowitz, A. S.; Lange, Jr., C. F. (1964). Streptococcal related glomerulonephritis. I. Isolation, immunochemistry, and comparative chemistry of soluble fractions from type 12 nephritogenic streptococci and human glomeruli J. Immunol. 92: 565-575
- Markwell, M. A. K.; Haas, S. M.; Bieber, L. L.; Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87: 206-210
- Martin, D. R. (1988). Rheumatogenic streptococci reconsidered. N. Z. Med. J. 101: 394-396

- Martinez-Hernandez, A. (1987). Electron immune histochemistry of the extracellular matrix: an overview.
Meth. Enzymol. 145: 78-103
- Massell, B. F.; Honikman, L. H.; Amezcua, J. (1969). Rheumatic fever following streptococcal vaccination.
J. A. M. A. 207: 1115-1119
- Maxted, W. R.; Potter, E. V. (1967). The presence of type 12 M-protein antigen in group G streptococci.
J. Gen. Microbiol. 49: 119-125
- McIntosh, R. M.; Garcia, R.; Rubio, L.; Rabideau, D.; Allen, J. E.; Carr, R. I.; Rodriguez-Iturbe, B. (1978). Evidence for an autologous immune complex pathogenic mechanism in acute poststreptococcal glomerulonephritis.
Kidney Int. 14: 501-510
- Mezzano, S.; Olavarria, F.; Ardiles, L.; López, M. I. (1986). Incidence of circulating immune complexes in patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis and in patients with streptococcal impetigo.
Clin. Nephrol. 26: 61-65
- Michael, A. F.; Drummond, K. N.; Good, R. A.; Vernier, R. L. (1966). Acute poststreptococcal glomerulonephritis: immune deposit disease.
J. Clin. Invest. 45: 237-248
- Misra, R. P. (1972). Isolation of glomeruli from mammalian kidneys by graded sieving.
Am. J. Clin. Pathol. 58: 135-139
- Moody, M. D.; Padula, J.; Lizana, D.; Hall, C. T. (1965). The usefulness of T-typing to supplement M-typing of group A streptococci by this study. Epidemiologic characterization of group A streptococci by T-agglutination and M-precipitation tests in the public health laboratory.
Health Lab. Sci. 2: 149-162
- Morávek, L.; Kühnemund, O.; Havlíček, J.; Kopecký, P.; Pavlík, M. (1986). Type 1 M protein of Streptococcus pyogenes. N-terminal sequence and peptic fragments.
FEBS Lett. 208: 435-438
- Nissenson, A. R.; Baraff, L. J.; Fine, R. N.; Knutson, D. W. (1979). Poststreptococcal acute glomerulonephritis: fact and controversy.
Ann. Int. Med. 91: 76-86

- Ohkuni, H.; Friedman, J.; van de Rijn, I.; Fischetti, V. A.; Poon-King, T. (1983). Immunological studies of post-streptococcal sequelae serological studies with an extracellular protein associated with nephritogenic streptococci.
Clin. Exp. Immunol. 54: 185-193
- Osborn, M.; Born, T.; Koitsch, H.-J.; Weber, K. (1978). Stereo immunofluorescence microscopy: I. Three-dimensional arrangement of microfilaments, microtubules, and tonofilaments.
Cell 14: 477-488
- Osborn, M.; Franke, W. W.; Weber, K. (1977). Visualization of a system of filaments 7-10 nm thick in cultured cells of an epithelioid line (Pt K2) by immunofluorescence microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2490-2494
- Pakula, R. (1951). Extraction of the T antigen of *Streptococcus pyogenes*.
J. Gen. Microbiol. 5: 640-647
- Pancholi, V.; Fischetti, V. A. (1988). Isolation and characterization of the cell-associated region of group A streptococcal M6 protein.
J. Bacteriol. 170: 2618-2624
- Parker, M. T. (1969). Streptococcal skin infection and acute glomerulonephritis.
Br. J. Dermatol. 81, Suppl. 1: 37-46
- Peterson, P. K.; Schmeling, D.; Cleary, P.G.; Wilkinson, B. J.; Kim, Y.; Quie, P. G. (1979). Inhibition of alternative complement pathway opsonization by group A streptococcal M protein.
J. Infect. Dis. 139: 575-585
- Phillips, Jr., G. N.; Flicker, P. F.; Cohen, C.; Manjula, B. N.; Fischetti, V. A. (1981). Streptococcal M protein: α -helical coiled-coil structure and arrangement on the cell-surface
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4689-4693
- Pincus, S. H.; Shigeoka, A. O.; Moe, A. A.; Ewing, L. P.; Hill, H. R. (1988). Protective efficacy of IgM monoclonal antibodies in experimental group B streptococcal infection is a function of antibody avidity.
J. Immunol. 140: 2779-2785
- Poirier, T. P.; Kehoe, M. A.; Beachey, E. H. (1988). Protective immunity evoked by oral administration of attenuated *aro* A *Salmonella typhimurium* expressing cloned streptococcal M protein.
J. Exp. Med. 168: 25-32

- Poirier, T. F.; Kehoe, M. A.; Whitnack, E.; Dockter, M. E.; Beachey, E. H. (1989). Fibrinogen binding and resistance to phagocytosis of *Streptococcus sanguis* expressing cloned M protein of *Streptococcus pyogenes*.
Infect. Immun. 57: 29-35
- Poon-King, T.; Mohammed, I.; Cox, R.; Potter, E. V.; Simon, N.M.; Siegal, A. C.; Earle, D.P. (1967). Recurrent epidemic nephritis in South Trinidad.
N. Engl. J. Med. 277: 728-733
- Potter, E. V.; Shaughnessy, M. A.; Poon-King, T.; Early, D.P. (1982). Streptococcal neuraminidase and acute glomerulonephritis.
Infect. Immun. 38: 1196-1202
- Potter, E. V.; Svartman, M.; Mohammed, I.; Cox, R.; Poon-King, T.; Earle, D. P. (1978). Tropical acute rheumatic fever and associated streptococcal infections compared with concurrent acute glomerulonephritis.
J. Pediatr. 92: 325-333
- Prakash, K.; Bhatnagar, P. K.; Prakash, C. (1988). The possible role of complement and circulating immune complexes in streptococcal infections and its sequelae.
Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. 2: 227-231
- Quax, W.; Egberts, W. V.; Hendriks, W.; Quax-Jeuken, Y.; Bloemendal, H. (1983). The structure of the vimentin gene.
Cell 35: 215-223
- Rammelkamp, C. H. (1980). Acute poststreptococcal glomerulonephritis. In: Streptococcal diseases and the immune response. Herausgeber: Read, S. E.; Zabriskie, J. B. Academic Press, New York. S. 43-51
- Rammelkamp, Jr., C. H.; Weaver, R. S. (1953). Acute glomerulonephritis. The significance of the variations in the incidence of the disease.
J. Clin. Invest. 32: 345-358
- Reid, H. F. M.; Bassett, D. C. J.; Poon-King, T.; Zabriskie, J. B.; Read, S. E. (1985). Group G streptococci in healthy school-children and in patients with glomerulonephritis in Trinidad.
J. Hyg. 94: 61-68
- Reynolds, J. A.; Tanford, C. (1970). Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66: 1002-1007

- van de Rijn, I.; Fillit, H.; Brandeis, W. E.; Reid, H.; Poon-King, T.; McCarthy, M.; Day, N. K.; Zabriskie, J. B. (1978). Serial studies on circulating immune complexes in post-streptococcal sequelae. Clin. Exp. Immunol. 34: 318-325
- van de Rijn, I.; Zabriskie, J. B.; McCarty, M. (1977). Group A streptococcal antigens cross-reactive with myocardium. Purification of heart reactive antibody and isolation and characterization of the streptococcal antigen. J. Exp. Med. 146: 579-599
- Robbins, J. C.; Spanier, J. G.; Jones, S. J.; Simpson, W. J.; Cleary, P. P. (1987). Streptococcus pyogenes type 12 M protein gene regulation by upstream sequences. J. Bacteriol. 169: 5633-5640
- Rodriguez-Iturbe, B.; Garcia, R.; Rubio, L.; Cuenca, L.; Treser, G.; Lange, K. (1976). Epidemic glomerulonephritis in Maracaibo. Evidence for progression to chronicity. Clin. Nephrol. 5: 197-206
- Rodriguez-Iturbe, B.; Gastillo, L.; Valbuena, R.; Cuenca, L. (1979). Acute poststreptococcal glomerulonephritis. A review of recent developments. Paediatrician 8: 307-324
- Rothbard, S.; Watson, R. F. (1948). Variation occurring in group A streptococci during human infection. Progressive loss of M substance correlated with increasing susceptibility to bacteriostasis. J. Exp. Med. 87: 521-533
- Runehegn, A.; Schönbeck, C.; Hedner, U.; Hessel, B.; Kronvall, G. (1981). Binding of fibrinogen degradation products to S. aureus and to β -hemolytic streptococci group A, C, and G. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B 89:49-55
- Schalén, C.; Burova, L. A.; Christensen, P.; Grubb, R.; Samuelsson, G.; Svensson, M.-L. (1981). IgG F(ab')₂ of rabbit anti-M sera but not the unfractionated sera are bactericidal for some group A streptococci with IgG Fc-receptor activity. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C 89: 247-252
- Schalén, C.; Christensen, P.; Grubb, R. (1978). Lancefield extract of group A streptococci type 15 acts like an anti-human IgG with restricted specificity. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C 86: 41-43

- Schalén, C.; Christensen, P.; Grubb, A.; Samuelsson, G.; Svensson, M.-L. (1980). Demonstration of separate receptors for human IgA and IgG in group A streptococci type 4.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C. 88: 77-82
- Schlievert, P. M.; Bettin, K. M.; Watson, D. W. (1977). Purification and characterization of group A streptococcal pyrogenic exotoxin type C.
Infect. Immun. 16: 673-679
- Schmidt, K.-H.; Kühnemund, O.; Wadström, T.; Köhler, W. (1987). Binding of fibrinogen fragment D to group A streptococci causes strain dependent decrease in cell surface hydrophobicity as measured by the salt aggregation test (SAT) and cell clumping in polyethylene glycol.
Zbl. Bakt. Hyg. A 264: 185-195
- Schwab, J. H.; Cromartie, W. J.; Roberson, B. S. (1959). Identification of a toxic cellular component of group A streptococci as a complex of group-specific C-polysaccharide and a protein.
J. Exp. Med. 109: 43-54
- Scott, J. R.; Guenther, P. C.; Malone, L. M.; Fischetti, V. A. (1986a). Conversion of an M⁻ group A streptococcus to M⁺ by transfer of a plasmid containing an M6 gene.
J. Exp. Med. 164: 1641-1651
- Scott, J. R.; Hollingshead, S. K.; Fischetti, V. A. (1986b). Homologous regions within M protein genes in group A streptococci of different serotypes.
Infect. Immun. 52: 609-612
- Seegal, B. C.; Andres, G. A.; Hsu, K. C.; Zabriskie, J. B. (1965). Studies on the pathogenesis of acute and progressive glomerulonephritis in man by immunofluorescein and immunoferritin techniques.
Fed. Proc. 24I, 100 -108
- Seligson, G.; Lange, K.; Majeed, H. A.; Deol, H.; Cronin, W.; Bovie, R. (1985). Significance of endostreptosin antibody titers in poststreptococcal glomerulonephritis.
Clin. Nephrol. 24: 69-75
- Sesso, R. C. C.; Ramos, O. L.; Pereira, A. B. (1986). Detection of IgG-rheumatoid factor in sera of patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis and its relationship with circulating immune complexes.
Clin. Nephrol. 26: 55-60

- Siegel, J. L.; Hurst, S. F.; Liberman, E. S.; Coleman, S. E.; Bleiweis, A. S. (1981). Mutanolysin-induced spheroplasts of *Streptococcus mutans* are true protoplasts.
Infect. Immun. 31: 808-815
- Smyth, C. J.; Duncan, J. L. (1978). Thiol-activated (oxygen-labile) cytolysins.
In: Bacterial toxins and cell membranes. Herausgeber: Jeljaszewicz, J.; Wadström, T. Academic Press, London. S. 129-183
- Sorger, K. (1985). Subtypen der akuten postinfektiösen Glomerulonephritis.
Funkt. Biol. Med. 4: 173-183
- Sorger, K.; Gessler, U.; Hübner, F. K.; Köhler, H.; Schulz, W.; Stühlinger, W.; Thoenes, G. H.; Thoenes, W. (1982). Subtypes of acute postinfectious glomerulonephritis. Synopsis of clinical and pathological features.
Clin. Nephrol. 17: 114-128
- Steinert, P. M.; Parry, D. A. D. (1985). Intermediate filaments: conformity and diversity of expression and structure.
Ann. Rev. Cell. Biol. 1: 41-65
- Steinert, P. M.; Rice, R. H.; Roop, D. R.; Trus, B. L.; Steven, A. C. (1983). Complete amino acid sequence of a mouse epidermal keratin subunit and implications for the structure of intermediate filaments.
Nature 302: 794-800
- Steinert, P. M.; Steven, A. C.; Roop D. R. (1985). The molecular biology of intermediate filaments.
Cell 42: 411-419
- Stinson, M. W.; Bergey, E. J. (1982). Isolation of a heart- and kidney-binding protein from group A streptococci.
Infect. Immun. 35: 335-342
- Stollerman, G. H. (1971). Rheumatogenic and nephritogenic streptococci.
Circulation 43: 915-921
- Swartzwelder, F. J.; Barua, P. K.; Albin, B.; Stinson, M. W. (1988). Heart-reactive antibodies in rabbit anti-*Streptococcus mutans* sera fail to cross-react with *Streptococcus mutans*.
J. Immunol. 140: 954-961

- Switalski, L. M.; Speziale, P.; Höök, M., Wadström, T.; Timpl, R. (1984). Binding of *Streptococcus pyogenes* to laminin. *J. Biol. Chem.* 259: 3734-3738
- Tarr, G. E. (1986). Manual Edman Sequencing System. In: *Methods of protein microcharacterization*. Herausgeber: Shively, J. E. Humana Press, Clifton, New York. S. 183-185
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- Treser, G.; Semar, M.; McVicar, M.; Franklin, M., Ty, A.; Sagel, I.; Lange, K. (1969). Antigenic streptococcal components in acute glomerulonephritis. *Science* 163: 676-677
- Treser, G.; Semar, M., Ty, A.; Sagel, I.; Franklin, M. A., Lange, K. (1970). Partial characterization of antigenic streptococcal plasma membrane components in acute glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 49: 762-768
- Veasy, L. G.; Wiedmeier, S. E.; Hill, H. R. (1986). The reappearance of epidemic acute rheumatic fever in the U.S. In: *Abstracts. Annual Meeting of the Lancefield Society 1986*, New Orleans. S. 9
- Villarreal, Jr., H.; Fischetti, V. A.; van de Rijn, I.; Zabriskie, J. B. (1979). The occurrence of a protein in the extracellular products of streptococci isolated from patients with acute glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 149: 459-472
- Vogl, W.; Renke, M.; Mayer-Eichberger, D.; Schmitt, M.; Bohle, A. (1986). Long-term prognosis for endocapillary glomerulonephritis of poststreptococcal type in children and adults. *Nephron* 44: 58-65
- Vogt, A.; Batsford, S.; Rodriguez-Iturbe, B.; Garcia, R. (1983). Cationic antigens in poststreptococcal glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 20: 271-279
- Wagner, B.; Wagner, M.; Ryc, M. (1983). Morphological evidence for different types of IgG-Fc receptors in group A streptococci. *Int. Bakt. Rev.* 45: 61-71

- Wannamaker, L. W. (1970). Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin.
N. Engl. J. Med. 282: 78-85
- Watson, R. F.; Lancefield, R. C. (1944). Studies on the antigenic composition of group A hemolytic streptococci. III. Types with serologically identical M but distinct T antigens: types 10 and 12.
J. Exp. Med. 79: 89-98
- Weber, C. (1989). Entwicklung einer spezifischen Methode zur Lokalisierung von Phosphoserin. Anwendung für die Lokalisierung der intrinsischen Phosphorylierungsstellen der β -Untereinheit der Phosphorylase Kinase aus Kaninchenskelettmuskel.
Dissertation, Bochum
- Weber, K.; Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244: 4406-4412
- Weeks, C. R.; Ferretti, J. J. (1984). The gene for type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) is located in bacteriophage T12.
Infect. Immun. 46: 531-536
- Weeks, C. R.; Ferretti, J. J. (1986). Nucleotide sequence of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage T12.
Infect. Immun. 52: 144-150
- Wexler, D. E.; Chenoweth, D. E.; Cleary, P. P. (1985). Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8144-8148
- Wexler, D. E.; Cleary, P. P. (1985). Purification and characteristics of the streptococcal chemotactic factor inactivator.
Infect. Immun. 50: 757-764
- Whitnack, E.; Beachey, E. H. (1982). Antiopsonic activity of fibrinogen bound to M protein on the surface of group A streptococci.
J. Clin. Invest. 69: 1042-1045
- Whitnack, E.; Beachey, E. H. (1985 a). Biochemical and biological properties of the binding of human fibrinogen to M protein in group A streptococci.
J. Bacteriol. 164: 350-358

- Whitnack, E.; Beachey, E. H. (1985 b). Inhibition of complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by D fragments of fibrinogen and fibrin bound to cell surface M protein. *J. Exp. Med.* 162: 1983-1997
- Whitnack, E.; Bisno, A. L.; Beachey, E. H. (1981). Hyaluronate capsule prevents attachment of group A streptococci to mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 31: 985-991
- Whitnack, E.; Dale, J. B.; Beachey, E. H. (1984). Common protective antigens of group A streptococcal M proteins masked by fibrinogen. *J. Exp. Med.* 159: 1201-1212
- Williams, C. L., Lennon, V. A. (1986). Thymic B lymphocyte clones from patients with myasthenia gravis secrete monoclonal strational autoantibodies reacting with myosin, α -actinin, or actin. *J. Exp. Med.* 164: 1043-1059
- Williams, D. G.; Kourilsky, O.; Morel-Maroger, L.; Peters, D. K. (1972). C3 breakdown by serum from patients with acute poststreptococcal nephritis. *Lancet* 2: 360-361
- Williams, W. (1987). Poststreptococcal glomerulonephritis: how important is it as a cause of chronic renal diseases. *Transplant. Proc.* 19, Suppl.2, 97-100
- Woolcock, J. B. (1974). Purification and antigenicity of an M-like protein of *Streptococcus equi*. *Infect. Immun.* 10: 116-122
- Yoshizawa, N.; Treser, G.; Sagel, I.; Ty, A.; Ahmed, U.; Lange, K. (1973). Demonstration of antigenic sites in glomeruli of patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis by immunofluorescein and immunoferritin technics. *Am. J. Pathol.* 70: 131-150
- Zabriskie, J. B.; Freimer, E. H. (1966). An immunological relationship between the group A streptococcus and mammalian muscle. *J. Exp. Med.* 124: 661-678
- Zabriskie, J. B.; Hsu, K. C.; Seegal, B. C. (1970). Heart-reactive antibody associated with rheumatic fever: characterization and diagnostic significance. *Clin. Exp. Immunol.* 7: 147-159

Zehner, Z. E.; Li, Y.; Roe, B. A.; Paterson, B. M.; Sax, C. M. (1987).
The chicken vimentin gene. Nucleotide sequence, regulatory
elements, and comparison to the hamster gene.
J. Biol. Chem. 262: 8112-8120

Lebenslauf

Name: Sabine Birkholz

Geburtsdatum: 22.10.1960

Geburtsort: Castrop-Rauxel/Kreis Recklinghausen

Eltern: Friedhelm Birkholz
Leni Birkholz, geb. Graba

Familienstand: verheiratet

Schul Ausbildung: 1966-1970 Besuch der Grundschule in Castrop-Rauxel
1970-1979 Besuch des Ernst-Barlach-Gymnasiums in Castrop-Rauxel
1979 Abitur

Hochschulausbildung: Oktober 1979 - Dezember 1985 Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster; Abschluß mit der Diplom-Hauptprüfung
Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster mit dem Thema: "Untersuchungen zur Stereospezifität des Lysineinbaus in Hydroxypyridylhomothreonin durch *Streptomyces tendae*"

Weiterbildung: Januar 1986 Beginn der Promotion in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie an der Ruhr-Universität Bochum unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch

